



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STRESOVÁ ODOLNOST BAKTERIÁLNÍCH MONOKULTUR
A SMĚSNÝCH KULTUR**

STRESS RESISTANCE OF BACTERIAL PURE CULTURES AND MIXED CULTURES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Chorvátová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1140/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Michaela Chorvátová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Stresová odolnost bakteriálních monokultur a směsných kultur

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Porovnání stresové odolnosti vybraných bakteriálních monokultur
3. Příprava definovaných směsných bakteriálních kultur a studium jejich odolnosti vůči vybraným stresorům

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Michaela Chorvátová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V tejto bakalárskej práci bola skúmaná stresová odolnosť bakteriálnych monokultúr a definovanej zmiešanej kultúry. Teoretickú časť predstavuje literárna rešerš, ktorá sa zaoberá všeobecnou stresovou odolnosťou baktérií a dynamikou ich rastu. Ďalej sú predstavené polyhydroxyalkanoáty, ich zapojenie do stresovej odpovede baktérií a významná moderná metóda akou je prietoková cytometria, ktorá predstavovala dôležitú súčasť experimentu. V experimentálnej časti bola študovaná odolnosť voči osmotickému a teplotnému stresu. Pre tento účel boli použité monokultúry PHA akumulujúceho kmeňa *Cupriavidus necator* H16 a mutantného kmeňa *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 neschopného akumulácie PHA. Definovaná zmiešaná kultúra bola pripravená kokultiváciou týchto dvoch kmeňov. Celkovo možno konštatovať, že akumulácia a utilizácia PHA, konkrétne poly(3-hydroxybutyrátu), zvýšila odolnosť baktérií, čo sa najviac prejavilo u osmotického stresu, kedy koncentrácie soli nespôsobili výraznejšie zníženie viability u *Cupriavidus necator* H16 oproti mutantnému kmeňu, ktorého viabilita klesala s rastúcou intenzitou stresu. Experimentálne teploty naopak nepredstavovali výrazný vplyv na viabilitu buniek, pričom sa takmer vždy potvrdilo, že baktériám sa najviac darilo pri ich teplotnom optime 30 °C.

ABSTRACT

The purpose of this bachelor thesis was to investigate a stress resistance of bacterial monocultures and defined mixed culture. The theoretical part contains a literary review, which deals with the general stress resistance of bacteria and the dynamics of their growth. Furthermore, polyhydroxyalkanoates are introduced, as well as their involvement into stress response of bacteria. In this review was also elaborated the flow cytometry, significant modern method, which was important part of the experiment. In the experimental part, the resistance to osmotic and temperature stress was studied. For this purpose, monocultures of the PHA accumulating strain *Cupriavidus necator* H16 and the mutant strain *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 unable to accumulate PHA were used. The defined mixed culture was prepared by cocultivating these two strains. Overall, the accumulation and utilization of PHA, namely poly(3-hydroxybutyrate), increased the resistance of bacteria. The most notable was the increase in the case of osmotic stress, when salt concentrations did not significantly reduce the viability of *Cupriavidus necator* H16 against a mutant strain which viability decreased with growing intensity of stress. On the other hand, experimental temperatures did not have a significant effect on cell viability. The highest growth of bacteria was recorded, in most cases, at their temperature's optimum of 30 °C.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Stresová odolnosť baktérií, polyhydroxyalkanoáty, poly(3-hydroxybutyrát), stresové faktory, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4, kokultivácia, prietoková cytometria, plynová chromatografia

KEY WORDS

Stress resistance of bacteria, polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate), stress factors, *Cupriavidus necator* H16, *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4, cocultivation, flow cytometry, gas chromatography

CHORVÁTOVÁ, M. *Stresová odolnosť bakteriálnych monokultúr a smesných kultúr*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 56 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE:

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne a že som všetky použité literárne zdroje správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana fakulty FCH VUT.

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Touto cestou by som sa rada poďakovala vedúcemu svojej bakalárskej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za odborné vedenie a užitočné rady pri spracovávaní teoretickej a praktickej časti práce. Ďalej patrí moja vďaka Ing. Pavle Benešovej za pomoc pri práci v laboratóriu a konzultantovi Ing. Danovi Kučerovi za cenné rady pri spracovávaní práce a taktiež za ochotnú pomoc v laboratóriu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Stresové faktory pre baktérie.....	8
2.1.1	Odpoveď baktérií na zmeny podmienok	9
2.1.1.1	Fyziologická adaptácia	9
2.1.1.2	Genetická adaptácia.....	9
2.1.1.3	Epigenetická adaptácia	9
2.1.2	Mechanizmus vnímania zmien podmienok.....	9
2.1.3	Bunečné membrány počas odpovede na stresy	10
2.1.3.1	Dopad zmien v tekutosti membrány.....	10
2.1.4	Všeobecná regulačná sieť	11
2.1.4.1	Sigma faktory	11
2.1.4.2	Regulátor Fur.....	12
2.2	Vybrané stresové faktory	12
2.2.1	Oxidačný stres	12
2.2.1.1	Odpoveď na oxidačný stres	12
2.2.2	Osmotický stres	13
2.2.2.1	Odpoveď na osmotický stres	13
2.2.3	Teplotný stres a odpoveď	14
2.2.4	Acidický stres	15
2.2.4.1	Odpoveď na acidický stres	15
2.2.4.2	Cross-protection	15
2.2.5	Ťažké kovy	15
2.2.5.1	Stresová odpoveď na ťažké kovy	16
2.3	Rast baktérii.....	16
2.3.1	Rastová krivka.....	16
2.4	Biofilm bakteriálnych monokultúr a zmiešaných kultúr.....	18
2.5	Polyhydroxyalkanoáty.....	19
2.5.1	Fyzikálne vlastnosti.....	20
2.5.2	Biosyntéza PHA	20
2.5.3	Tvorba granulí in vivo.....	21
2.5.3.1	Baktéria <i>Cupriavidus necator</i>	22
2.6	Prietoková cytometria	23
2.6.1	Princíp prietokovej cytometrie	23
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje.....	25
3.1.1	Použité baktérie	25
3.1.2	Použité chemikálie	25
3.1.3	Použité prístroje.....	25
3.2	Kultivácia baktérií	25
3.2.1	Príprava inokula	25
3.2.2	Živné médiá.....	26
3.3	Stanovenie biomasy.....	26

3.3.1	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy	26
3.3.2	Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy	26
3.4	Stanovenie obsahu PHB v biomase.....	27
3.5	Stanovenie viability výsevom	27
3.6	Stanovenia s využitím prietokovej cytometrie	27
3.6.1	Stanovenie viability s použitím propidium jodidu	27
3.6.2	Stanovenie zastúpenia buniek pomocou Nilskej červene.....	28
4	VÝSLEDKY A DISKUSIE	29
4.1	Vplyv teplotného stresu.....	29
4.1.1	Stanovenie biomasy spektrofotometricky	29
4.1.2	Stanovenie obsahu PHB v biomase.....	30
4.1.3	Stanovenie viability monokultúr jednotlivých kmeňov	31
4.1.3.1	Stanovenie viability výsevom	31
4.1.3.2	Stanovenie viability prietokovou cytometriou	32
4.2	Vplyv osmotického stresu	34
4.2.1	Stanovenie biomasy.....	34
4.2.1.1	Stanovenie biomasy gravimetriou	34
4.2.1.2	Stanovenie biomasy spektrofotometrickou metódou	36
4.2.2	Stanovenie obsahu PHB v biomase.....	37
4.2.3	Stanovenie viability prietokovou cytometriou	38
4.3	Kokultivácia oboch kmeňov <i>Cupriavidus necator</i>	40
4.3.1	Stanovenie biomasy.....	40
4.3.1.1	Stanovenie biomasy gravimetriou	40
4.3.1.2	Stanovenie biomasy spektrofotometrickou metódou	41
4.3.2	Stanovenie percentuálneho zastúpenia jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre	42
4.3.3	Stanovenie obsahu PHB v biomase.....	45
5	ZÁVER.....	47
6	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	49
7	SKRATKY	53
8	ZOZNAM PRÍLOH	54
9	PRÍLOHY.....	55

1 ÚVOD

Stres je neodvratnou súčasťou života všetkých organizmov. Evolučný proces je vo veľkej miere odrazom pretrvávajúceho konfliktu medzi organizmami a ich prostredím. Keďže akýkoľvek stresový stav je potenciálne škodlivý pre bunky, aj tie najprimitívnejšie organizmy sú vyzbrojené bunecnými mechanizmami, ktoré ich môžu ochrániť pred prípadnými poškodeniami spôsobenými stresmi. Baktérie sa vo svojom prirodzenom prostredí musia neustále vyrovnávať s rôznymi stresovými faktormi. Môže to byť chemický stres spôsobený toxickými a škodlivými zlúčeninami, fyzikálny stres ako je napríklad neoptimálna teplota, ale tiež obmedzené zásobovanie živinami a kompetičný tlak ostatných baktérií. V prírodnom prostredí zvyčajne nepôsobia stresy jednotlivo, ale ako komplex navzájom interagujúcich rôznych stresov.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú prirodzene sa vyskytujúce organické polyestery, ktoré v súčasnosti predstavujú veľmi zaujímavý objekt pre priemyselné a biomedicínske aplikácie vďaka ich vlastnostiam ako je biokompatibilita, biologická odbúrateľnosť a výroba z obnoviteľných zdrojov. Tieto biopolyméry sú syntetizované mnohými baktériami v časoch nevyváženej dostupnosti živín z rôznych substrátov vo forme nerozpustných sférických inklúzií v cytoplazme. V stresových podmienkach sú pomocou PHA depolymerizujúcich enzýmov degradované a tak slúžia ako intracelulárny zdroj uhlíka a energie. *Cupriavidus necator* je najbežnejšou baktériou, ktorá má schopnosť produkovať PHA a na celom svete je skúmaná ako modelový organizmus pre štúdium syntézy a akumulácie PHA.

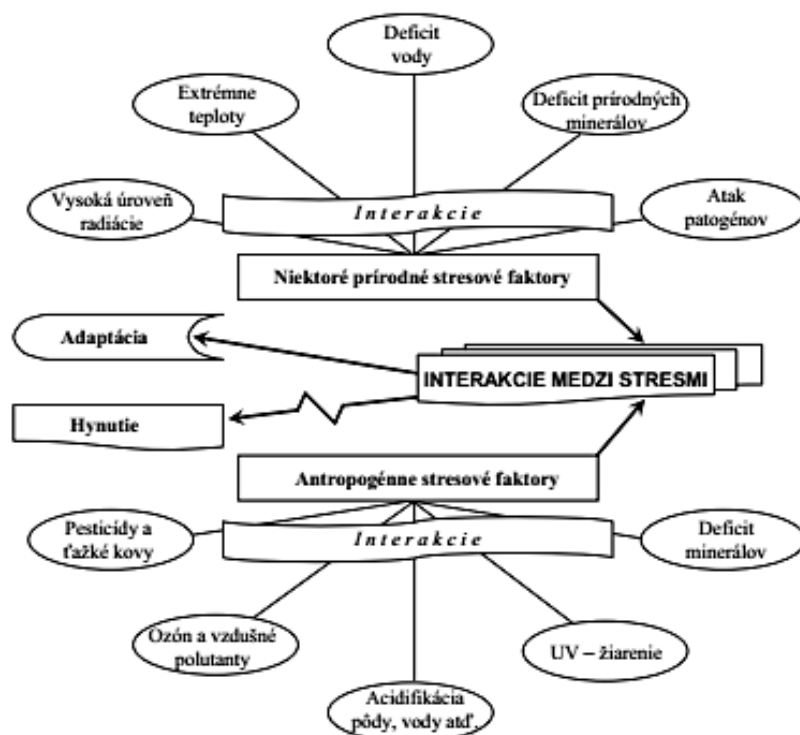
Cieľom tejto práce bolo porovnanie stresovej odolnosti kmeňa *Cupriavidus necator* H16, mutantného kmeňa *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 neschopného akumulácie PHA a zmiešanej kultúry týchto dvoch kmeňov pri teplotnom a osmotickom strese. Bola skúmaná prítomnosť PHA a jej vplyv na stresovú odolnosť, pričom boli využívané metódy ako je prietoková cytometria, stanovenie biomasy gravimetriou a spektrofotometriou, či plynová chromatografia.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Stresové faktory pre baktérie

Rozmnožovanie organizmov podmieňuje rast a následné delenie buniek. V priaznivých podmienkach prostredia sa rastúca jednobunková populácia zdvojnásobuje v pravidelných intervaloch, pretože obidve dcérske bunky vzniknuté rozdelením materskej bunky, majú rovnaký rastový potenciál ako materská bunka. Avšak rast bakteriálnej populácie neprebíha stále exponenciálne. Jeho spomalenie býva často spôsobené nepriaznivými faktormi prostredia, ktoré sa nazývajú aj stresové faktory či stresory, ktoré zapríčiňujú zmeny podmienok prostredia. Akákoľvek zmena prostredia, ktorá vyvoláva fyziologickú, genetickú alebo epigenetickú odpoveď u mikroorganizmov môže byť považovaná za stres. Z historického hľadiska boli formy stresov ovplyvňujúce biologické štruktúry klasifikované buď ako neteplotné, napr. osmotický, oxidačný či acidický stres, alebo ako teplotné, narastanie teploty (teplo) a pokles teploty (chlad). V súčasnosti sú stresy v biológii klasifikované ako abiotické, zahŕňajúce fyzikálne a chemické stresy, alebo biotické. [1]

Stresové faktory môžu byť buď prírodné – extrémne teploty, deficit vody a jej hustota, narastajúca salinita pôdy, vysoká úroveň slnečnej radiácie, spotreba živín, tvorba toxických produktov, alebo súvisiace s ľudskou aktivitou tzv. antropogénne stresové faktory - toxické znečistenie ako napr. pesticídy, škodlivé plyny (SO_2 , NO_x , O_3 , smog), oxidanty, acidifikácia pôdy a vody, deficit minerálov v dôsledku kyslých dažďov, nadmerné používanie priemyselných hnojív, ťažké kovy a podobne. V prírodnom prostredí zvyčajne na mikroorganizmus nepôsobí len jeden faktor, ale často pôsobí naraz niekoľko rôznych faktorov, ktoré sa navzájom ovplyvňujú (Obrázok 1). [1]



Obrázok 1: Stresové faktory a ich vzájomné interakcie [1]

Keďže je pomerne ťažké definovať pojem "normálny" s ohľadom na evolúciu bunky, vhodnejšia je definícia zo širšieho pohľadu: „Stres je akákoľvek zmena v genóme, proteóme alebo prostredí, ktorá spôsobí buď obmedzenie rastu alebo potenciálu pre prežitie. Takéto zmeny vedú k pokusom buniek o obnovenie vzoru metabolizmu, ktorý im buď umožní prežiť alebo im umožní rýchlejši rast“. Ak mikroorganizmus neprežije, mechanizmus ktorým nastane bunčná smrť ako apoptóza, nekróza, pyróptóza či autofágia často závisí od jeho schopnosti vyrovnať sa s podmienkami a stresmi, ktorým je vystavený. Stres sa tiež môže definovať aj ako akákoľvek zmena parametrov prostredia vyvolávajúca odpoveď u živých organizmov. [1], [2]

2.1.1 Odpoveď baktérií na zmeny podmienok

Jednobunkové prokaryotické organizmy prežívajú tak dlho v prostredí, kým im podmienky prostredia umožňujú replikáciu. Ak zmeny podmienok prostredia zabránia deleniu buniek, potom odumierajú. Preto, ak chcú prežiť, musia odpovedať zmenami vo vlastnej bunke. Takáto odpoveď sa môže dočeliť buď genetickou modifikáciou (mutáciou), alebo adaptáciou fenotypu. Sú známe tri typy adaptácií vedúcich k fenotypickým modifikáciám, a to fyziologická, genetická a epigenetická. [1]

2.1.1.1 Fyziologická adaptácia

Fyziologická adaptácia (reverzibilná a nededičná) je spojená s prechodným zvýšením rezistencie voči letálnym stresom pred pôsobením stredne silným neletálnym stresom, a to homologným alebo heterológnym (sprostredkovaná ochrana – cross protection). Homologické adaptácie boli študované na rôznych mikroorganizmoch, napr. *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Geotrichum candidum* atď. Heterológne adaptácie na chladový stres sú známe po pôsobení chemikáliami, napr. antibiotikami, osmotickými či kryoochrannými agens. [1]

2.1.1.2 Genetická adaptácia

Okrem okamžitej bunčnej adaptácie na stres, môžu organizmy odolať týmto zmenám prostredníctvom zmien vo vlastnom genetickom materiáli. Genetická adaptácia (ireverzibilná a dedičná) je výsledkom v prvom rade hlavne náhodnej mutácie a v druhom rade rekombinácie molekúl DNA nesúcich dedičné informácie. Limit pre genetickú adaptáciu predstavuje tlak prostredia. Preto je v týchto organizmoch súdržnosť každého druhu zaistená tlakom prostredia. [1], [3]

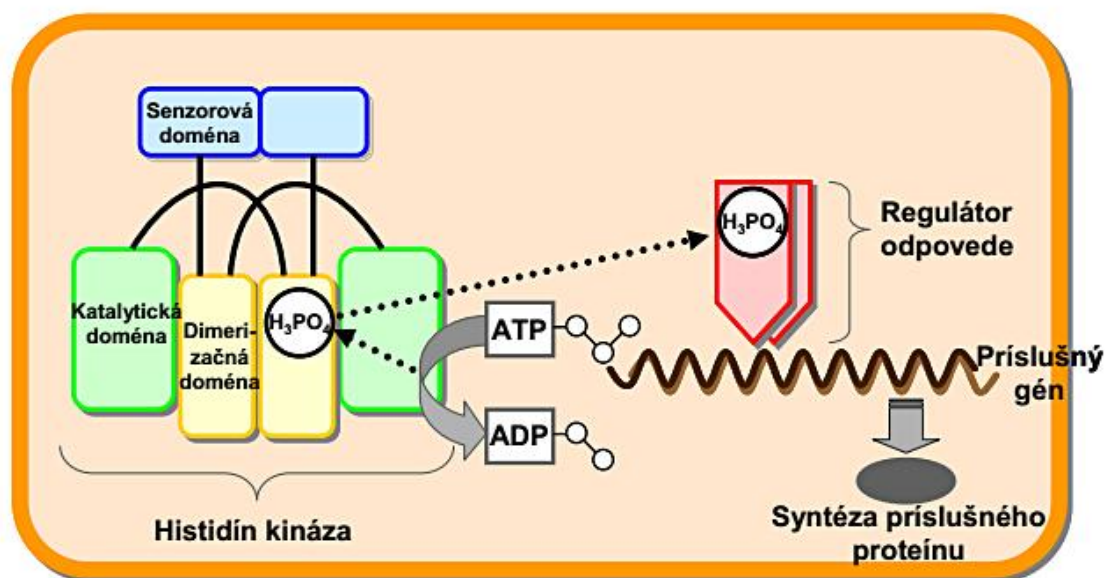
2.1.1.3 Epigenetická adaptácia

Epigenetická adaptácia (reverzibilná a "dedičná") je fenotypická modifikácia, ktorá sa prenáša z generácie na generáciu aj v zmenených podmienkach oproti podmienkam jej vzniku. Genetická adaptácia na stres u baktérií indukuje dva mechanizmy prežívania: aktiváciu mutagénnych odpovedí a inhibíciu antimutagénnych aktivít. Tieto mechanizmy prispievajú k zvýšeniu genetickej diverzity vyvolaním expresie veľmi širokej škály génov odpovedajúcich na stres a alternatívnych metabolických dráh. [1]

2.1.2 Mechanizmus vnímania zmien podmienok

Mikroorganizmy pociťujú rýchle zmeny prostredia, napr. zmeny v podmienkach svetla, teploty, kyslíka, stresu a živín a prežívajú vďaka ich schopnosti prispôsobiť sa týmto zmenám. Jednobunkové živé organizmy vnímajú zmeny prostredia prostredníctvom snímacieho systému, ktorý sa nazýva dvojzložkový signálny systém (Obrázok 2). Je to regulačný systém, ktorý sa

nachádza v baktériách, hubách a rastlinách a umožňuje ich adaptáciu na zmeny prostredia. [1] Dvojzložkový transdukčný signálny systém je v bakteriálnej ríši hlavným činiteľom, ktorý sprostredkováva prenos signálu z extracelulárneho prostredia do bunky. Tento systém je tvorený histidínkinázou, ktorá po detekcii signálu a autofosforylácii slúži ako donor fosfátu pre regulátor odpovedi. Ten funguje ako molekulárny spínač regulujúci rôzne bunčné mechanizmy od génovej expresie až po zmenu pohyblivosti. [4]



Obrázok 2: Schematické znázornenie dvojzložkového signálneho systému [1]

2.1.3 Bunčné membrány počas odpovede na stresy

Biologické membrány umožňujú prvý kontakt bunky s prostredím, a preto zohrávajú veľmi dôležitú úlohu počas odpovede bunky na stresy prostredia. Sú zložené z usporiadaných fosfolipidov, ktoré za fyziologických podmienok tvoria bimolekulárnu vrstvu s integrovanými proteínmi. Amfipatické fosfolipidy tvoria vo vodných roztokoch a v podobnom prostredí dvojvrstvovú štruktúru. Dynamické a štrukturálne charakteristiky membrány, a najmä lipidová zložka sa môžu meniť v závislosti od podmienok prostredia ako je teplota, vodný stres atď., rovnako ako pri raste a vývoji bunky. Predpokladá sa, že tieto zmeny sú potrebné na upravenie fyzikálnych vlastností membránových štruktúr tak, aby boli schopné vykonávať nevyhnutné fyziologické úlohy pri zmene faktorov prostredia. [1], [5]

2.1.3.1 Dopad zmien v tekutosti membrány

Keďže bunky majú prirodzenú tendenciu kompenzovať fyzikálne vplyvy prostredia na membránu, nevykompenzované zmeny by mohli viesť k poškodeniu buniek. Potom môže dôjsť k dvom situáciám, a to zmeny vo fyzikálnych charakteristikách membrány môžu viesť k poškodeniu bunky alebo zmeny môžu byť zahrnuté v odolnosti buniek voči extrémnym podmienkam. Zmeny v tekutosti membrány indukované environmentálnymi stresmi nie sú priamou príčinou poškodenia bunky alebo jej smrti. Modifikácia tekutosti membrány buniek v ich rastovom médiu má dôležitý vplyv na ich citlivosť voči rôznym stresom. Bunky sú schopné za účelom získania odolnosti meniť do určitej miery tekutosť membrány modifikáciou ich zloženia počas rastu buniek v kultúre. [1]

Napríklad tolerancia *S. cerevisiae* na teplo a ethanol je spojená so stupňom nenasýtenosti membránových lipidov. Stupeň saturácie lipidov a prítomnosť ergosterolu v membráne *S. cerevisiae* súvisí s toleranciou voči stresu nezávisle na prítomnosti heat-shock proteínov a trehalózy. Tieto výsledky naznačujú, že bunky sú schopné za účelom získania rezistencie meniť do určitej miery tekutosť membrány počas rastu buniek v kultúre. [1]

2.1.4 Všeobecná regulačná sieť

Bakteriálne bunky odpovedajú na stresové podmienky prostredia komplexným stimulovaním všeobecných regulačných systémov (regulónov) regulovaných na operónovej úrovni. Regulóny sa skladajú z veľkého počtu nespojených génov a operónov, ktoré sú koordinovane kontrolované spoločným regulačným génom. Kvôli lepšej orientácii sa zaviedol termín stimulón, ktorý predstavuje kompletnú sadu génov/proteínov odpovedajúcich na daný stresový faktor prostredia (stimul). Značná časť génov/proteínov určitého stimulónu je vo všeobecnosti jedinečná pre daný stresor. Stimulóny však obsahujú aj určitý počet ďalších génov/proteínov, ktoré sú indukované aj inými stresormi, a teda nie sú jedinečné pre daný stimul. Stimulón tak zahŕňa špecifické stresové proteíny indukované výhradne jedným stresovým faktorom, ako aj všeobecné stresové proteíny indukované dvomi alebo viacerými rozdielnymi stresormi, ktoré patria aj k iným stimulónom alebo regulónom. [1]

Bakteriálna bunka využíva všeobecnú regulačnú sieť odpovedajúcu na stresové podmienky prostredia. Medzi všeobecné odpovede bakteriálnej bunky na stres patrí odpoveď na teplotný šok kontrolovaná *htrP* génom, stringentná odpoveď regulovaná *relA/spoT* génmi a odpoveď na oxidačný stres, ktorá je kontrolovaná *oxyR* génom. Medzi všeobecné regulátory *E. coli* patrí Fur, ktorý riadi viac ako 90 génov, RpoS a úroveň nad-závitnicového vinutia chromozómu, ktoré môže postihnúť širokú oblasť procesov v bunke. Nad-závitnicové vinutie je mechanizmus, ktorý rýchlo prekladá zmeny v prostredí do transkripčných programov pri súčasnej indukcii a represii špecifických génov nezávisle na syntéze proteínov alebo môže bunka využiť úroveň nad-závitnicového vinutia na realizáciu príslušných transkripčných odpovedí. [1]

2.1.4.1 Sigma faktory

Sigma faktory sú trieda proteínov, ktoré predstavujú esenciálne disociovatelné podjednotky prokaryotickej RNA polymerázy. Združenie vhodných alternatívnych sigma faktorov s jadrom RNA polymerázy poskytuje mechanizmus pre buncné reakcie sprostredkované cez presmerovanie iniciácie transkripcie. Sigma faktory poskytujú promotoru rozpoznávaciu špecifitu na polymerázu a podieľajú sa na rozdelení reťazca DNA; potom sa oddeľujú z jadra RNA polymerázy po zahájení iniciácie transkripcie. [6]

Ako všeobecný regulátor stresovej odpovede u gramnegatívnych aj grampozitívnych baktérií sa považujú alternatívne sigma faktory σ^S (RpoS), ktoré spúšťajú rozličné stresové signály a sú často sprevádzané spomalením alebo zastavením rastu. Umožňujú bunkám prežiť nielen prítomné stresové podmienky, ale aj ďalšie stresy, ktorým bunky zatiaľ neboli vystavené (cross-protection). Zatiaľ čo špecifická stresová odpoveď eliminuje pôvodcu stresu a zaobstaráva opravu už poškodených buniek, tak všeobecná stresová odpoveď poskytuje bunke všeobecnú rezistenciu, a tak nedôjde k poškodeniu. [1], [6]

2.1.4.2 Regulátor Fur

Železo je jedným z najdôležitejších stopových prvkov potrebných pre rast baktérií a nevyhnutný kofaktor pre niekoľko proteínov, ktoré sa podieľajú na hlavných bunčných procesoch. Vzhľadom na nedostatok dostupného železa za aeróbnych podmienok a toxicitu voľného železa pri zvýšených koncentráciách cez Fentonovu reakciu, využívajú baktérie rad stratégií, ktorými regulujú intracelulárne koncentrácie železa. U väčšiny bakteriálnych druhov je hladina železa riadená regulátorom Fur (ferric uptake regulation). U gramnegatívnych baktérií, napr. u *E. coli*, transkripčný faktor Fur negatívne reguluje väčšinu génov/proteínov zúčastňujúcich sa transportu železa z vonkajšieho prostredia a je tiež dávany do súvislosti s reguláciou obrany voči oxidačnému stresu. Vo viacerých oxidačných mechanizmoch zohrávajú podstatnú úlohu komplexy železa s kyslíkom a cytotoxický efekt reaktívnych foriem kyslíka je do istej miery sprostredkovaný železom. Keďže železo zohráva dôležitú úlohu v premene menej reaktívnych metabolitov na reaktívnejšie, je veľmi dôležité, aby bol obsah železa regulovaný bunkou. Fur je spojený s rôznymi procesmi, v ktorých sa chová skôr ako univerzálny regulátor koordinujúci rozdielne odpovede v bunke, než ako vysoko špecifický transkripčný faktor. Z tohto dôvodu sa Fur zaradil medzi všeobecné regulátory gramnegatívnych baktérií, ktorý riadi viac ako 90 génov v bunkách *E. coli*. [1], [7]

2.2 Vybrané stresové faktory

2.2.1 Oxidačný stres

Nerovnováha medzi oxidantmi a antioxidantmi v prospech oxidantov, ktorá vedie k poškodeniu biomolekúl ako sú lipidy, proteíny a DNA sa nazýva oxidačný stres. [8]

Oxidanty sú tvorené ako bežný produkt bunčného metabolizmu, ktorý získava energiu oxidáciou a najdôležitejšie z nich sú reaktívne kyslíkové častice (ROS) a reaktívne dusíkaté častice (RNS). ROS skupina zahŕňa superoxid, peroxid vodíka, hydroxylové radikály a kyselinu chlórnu, zatiaľ čo najznámejšia neradikálová častica z RNS je pyroxyinitrit, ktorý vzniká reakciou oxidu dusnatého so superoxidom. Antioxidanty sú definované ako akákoľvek látka, ktorá je prítomná v nižšej koncentrácii, než oxidovaný substrát a výrazne spomaľuje alebo zabraňuje oxidácii substrátu. Antioxidanty sa podľa povahy ich vzniku delia na enzymatické a neenzymatické. Skupinu neenzymatických antioxidantov tvorí glutathion, kyselina askorbová, α -tokoferol, xantofyly, fenolické látky a karotenoidy a medzi enzymatické patrí superoxiddismutáza (SOD), glutathionperoxidáza či kataláza. Bunčný antioxidačný systém by mal byť schopný udržiavať hladinu ROS na určitej úrovni zaisťujúcej optimálnu funkciu bunky. [8], [9]

2.2.1.1 Odpoveď na oxidačný stres

Biologické ciele pre ROS sú DNA, RNA, proteíny a hlavne lipidy. Voľné radikály môžu napadnúť priamo polynenasýtené mastné kyseliny v membráne a vyvolať peroxidáciu lipidov, čo spôsobí pokles fluidity membrány, ktorý zmení jej vlastnosti a môže narušiť proteíny naviazané na membráne. Tento proces spôsobí ešte väčšiu tvorbu radikálov a polynenasýtené mastné kyseliny sú degradované na rôzne produkty ako napríklad aldehydy, ktoré sú veľmi reaktívne a môžu poškodiť aj vzdialené proteíny, pretože na rozdiel od voľných radikálov majú aldehydy pomerne dlhú životnosť, a preto sú schopné difundovať z miesta svojho vzniku. Pri napadnutí DNA reaktívne častice napádajú bázu aj zvyšky cukrov a spôsobujú zastavenie replikácie a mutácie. [9]

Reaktívne formy kyslíka vyvolávajú široké spektrum odpovedí na stres (Obrázok 3). Tieto reakcie závisia na závažnosti poškodenia, ktoré je ďalej ovplyvnené typom bunky, na rozsahu množstva ROS a dobe trvania stresu. Typicky, nízke množstvá ROS, najmä peroxidu vodíka sú mitogénne a podporujú proliferáciu buniek, zatiaľ čo stredne veľké množstvá vedú buď k dočasnému alebo úplnému zastaveniu rastu. Veľmi závažný oxidačný stres nakoniec spôsobí bunecnú smrť pomocou apoptických alebo nekrotických mechanizmov. [10]



Obrázok 3: Možné odozvy na rôzne množstvá ROS [10]

2.2.2 Osmotický stres

Osmotická premenlivosť životného prostredia je jedným z fyzikálnych parametrov, ktoré určujú schopnosť organizmu proliferovať v danom prostredí. Baktérie zažívajú osmotický stres, keď je osmotický tlak ich prostredia premenlivý, či už extrémne nízky alebo extrémne vysoký. Mechanizmy osmotickej stresovej tolerancie určujú, či baktéria prežije alebo bude rásť, pretože osmotický stres významne ovplyvňuje štruktúru, fyziku a chémiu bakteriálnych buniek. Osmotický tlak je koligatívna vlastnosť, pretože závisí na celkovej koncentrácii rozpustených látok v roztoku. Je často opisovaný pomocou osmolality, ktorá predstavuje koncentráciu osmoticky aktívnych látok na jednotku hmotnosti rozpúšťadla. Osmolalita prirodzeného bakteriálneho prostredia má hodnotu od 0 mol/kg (čistá voda) do 16 mol/kg a je zvyšovaná rôznymi rozpustenými látkami vrátane solí (NaCl) a cukrov. [11], [12]

2.2.2.1 Odpoveď na osmotický stres

Osmóza je tok vody skrz semipermeabilnú membránu v smere prostredia o vysokej koncentrácii osmoticky aktívnych látok z prostredia, kde je koncentrácia týchto látok nižšia a prebieha až do vyrovnania koncentrácie látok na oboch stranách membrány. [12]

Bakteriálna cytoplazmatická membrána je polopriepustná a ak voda vyteká z bunky von, prostredie okolo nej sa stáva viac koncentrované než prostredie vo vnútri, baktéria začne tento vodný tok zmierňovať akumuláciou alebo uvoľnením anorganických iónov (často K^+) a malých organických rozpustených molekúl, pričom niektoré z nich sú označované ako kompatibilné rozpustené látky (osmolyty), pretože nenarúšajú funkcie bunky. [11] Baktérie a Archaea akumulujú mnoho rôznych organických osmolytov ako je trehalóza, glutamát, betaín, ektoín, prolín a karnitín. Voľba osmolytu závisí na dĺžke trvania osmotického stresu a dostupnosti substrátov v okolí. [13]

Vzhľadom k tomu, že cytoplazmatická membrána baktérií je priepustná pre vodu, ale nie pre väčšinu ďalších metabolitov, hyperosmotický alebo hypoosmotický šok spôsobí okamžitý

odtok alebo príliv vody, ktorý je sprevádzaný súčasným poklesom alebo zvýšením cytoplazmatického objemu. [12]

Bunečné steny baktérií sú pevné a vydržia tlak až do 100 atm, hypoosmotický šok všeobecne vedie iba k menšiemu zvýšeniu objemu bunky. Obecné odpovede na zníženie osmolality prebiehajú v troch fázach: príjem vody (fáza I), vytlačanie vody a spolurozpúšťadiel (fáza II), reakumulácia cytoplazmatického spolurozpúšťadla a bunková remodelácia (fáza III). [12]

Hyperosmotický šok spôsobuje značné zmrštenie cytoplazmatického objemu tzv. plazmolýzu. Tento proces môže byť detegovaný ako okamžité zvýšenie turbidity kultúr po zavedení buniek do média vyvolávajúceho zvýšenú osmolaritu. Kinetika a rozsah plazmolýzy závisia na veľkosti nárastu osmolarity, avšak nie na charaktere použitých rozpustených látok, za predpokladu, že rozpustené látky sú vylúčené membránou z cytoplazmy. Molekuly, ktoré môžu voľne difundovať cez membránu ako ethanol alebo glycerol nespôsobujú plazmolýzu. V prípade, že hyperosmotický šok nie je príliš závažný, plazmolýza je iba dočasná a po určitej dobe sa cytoplazmatický objem zvýši ako výsledok prispôsobenia sa buniek. Avšak aj po tejto osmotickej adaptácii, ustálený stav cytoplazmatického objemu rastúcej baktérie je závislý na osmolarite média a to tak, že cytoplazmatický objem klesá s rastúcou vonkajšou osmolaritou. Mnoho z bunečných odpovedí vyvolaných osmotickými podnetmi prebieha paralelne. [12] Je pravdepodobné, že všeobecne reagujú baktérie na zvýšenie osmolality (osmotic upshifts) takiež v troch fázach: dehydratácia (strata nejakej bunkovej vody) (fáza I), úprava zloženia cytoplazmatického rozpúšťadla a rehydratácia (fáza II) a bunková remodelácia (fáza III). [14]

2.2.3 Teplotný stres a odpoveď

Bunky optimálne rastú v relatívne úzkom rozmedzí teplôt, ale tolerujú mierne odchýlky, z ktorých niektoré však zasahujú bunečnú štruktúru a funkciu či denaturujú proteíny, ktoré následne agregujú. Silný teplotný stres vedie k poškodeniu bunky či jej usmrteniu, subletálne dávky vyvolávajú bunečnú odozvu, ktorá (a) chráni bunky a organizmy pred vážnym poškodením, (b) umožňuje obnovenie normálnych bunečných a fyziologických aktivít, a (c) vedie k vyššej úrovni termotolerancie. Rozhodujúcim faktorom pre prežitie buniek je citlivosť voči tepelnej denaturácii a inaktivácii. Z toho dôvodu existujú rozličné adaptačné mechanizmy, ktoré chránia bunky pred proteotoxickými účinkami teplotného stresu. [15]

Jedným z najsilnejších adaptačných mechanizmov pri vysokých teplotách je indukcia génov, ktoré kódujú heat-shock proteíny (HSPs), vďaka ktorým sa bunka dokáže vyrovnať so stresom vyvolávaným poškodením proteínov. Heat-shock proteíny sú kódované génmi, ktoré potrebujú špecifický sigma faktor, sigma 32, pre transkripciu. Najčastejšími heat-shock proteínmi sú chaperóny (DnaK, GroEL) alebo ATP-závislé proteázy a hrajú dôležitú úlohu v skladaní proteínov, transporte a oprave pod stresovými či nestresovými podmienkami. Baktérie vyvinuli transkripčný kontrolný mechanizmus heat-shock génov používajúc rôzne komplikované stratégie pre reguláciu bunečnej hladiny HSPs tak, aby bol zaistený maximálny rast a prežitie, ak je baktéria vystavená teplotnému alebo inému stresu. [16]

Pri teplotách okolo nuly, pri ktorých dochádza k mrznutiu vody, je odpoveď väčšiny prokaryontov obyčajne pasívna a vedie k pomalému odumieraniu buniek, čo je spojené s kryopoškodením t.j. poškodením membrán a DNA. Na druhej strane, posunutie k pozitívnym nízkym hodnotám teploty (nad 0° C) zvyčajne koreluje s aktívnou odpoveďou baktérií, syntézou špecifických proteínov, ktoré sa nazývajú chladové stresové proteíny (CSP - cold stress proteins), spojenou s vývojom prechodnej fyziologickej adaptácie. [1] Napr. u *E. coli* zmena z 37 °C na 10 °C spôsobila zástavu rastu a po 4–5 h zníženie počtu syntetizovaných

proteínov a zmenu v zložení lipidov cytoplazmatickej membrány. Okrem toho sa v tomto období tvorili nové chladové stresové proteíny (podjednotka DNA gyrasy bola identifikovaná ako CSP). [16]

2.2.4 Acidický stres

Acidický stres môže byť opísaný ako kombinovaný biologický účinok nízkeho pH a slabých organických kyselín prítomných v prostredí. Slabé kyseliny vrátane prchavých mastných kyselín ako je kyselina maslová a propionová sú produktom fermentácie a v ich protonizovanej forme môžu difundovať cez bunecnú membránu a disociovať vo vnútri bunky, znižujúc vnútorné pH. Čím nižšie je vonkajšie pH, tým viac bude nedisociovaná slabá kyselina schopná prejsť cez membránu a ovplyvniť vnútorné pH. To znamená, že na usmrtenie bunky je potrebné menej organickej kyseliny napríklad pri vonkajšom pH 3,5 než pri pH 4,4. Intracelulárna akumulácia slabých kyselín je pre bunku rovnako škodlivá ako znižovanie vonkajšieho pH. [17]

2.2.4.1 Odpoveď na acidický stres

Baktérie ako *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a *Shigella flexneri* preferujú rast v neutrálnych pH podmienkach, no napriek tomu sú vystavené dramatickým výkyvom pH v prírode a počas patogenézy. Ako odpoveď na tieto výkyvy sa vyvinuli zložité komplexy indukovaných stratégií umožňujúcich prežitie acidického stresu. Regulačné funkcie zahŕňajú alternatívny sigma faktor (σ^s), dvojzložkové transdukčné signálne systémy a hlavný regulačný proteín Fur. Medzi špecifické mechanizmy prežitia patrí núdzový pH homeostatický systém indukovaný pomocou dekarboxyláz aminokyselín. [17]

Napríklad *Salmonella typhimurium* má rôzne indukovateľné systémy slúžiace na prežitie proti acidickému stresu v závislosti od toho, či sa bunky nachádzajú v exponenciálnej alebo stacionárnej fáze. [16] V exponenciálnej fáze bunky *Salmonella typhimurium* aktívne rástli pri vonkajšom pH 7,7 a po znížení pod pH 4 rapídne umierali. Avšak adaptáciou na mierne kyslé pH (vonkajšie pH 5,8) sa u jednej generácie zvýšila ich tolerancia voči extrémnejším podmienkam (pH 3). Táto indukovateľná tolerančná odpoveď je dvojstupňový proces zahŕňajúci prekryvanie acidických obranných systémov spúšťaných na rôznych úrovniach kyslosti. Pri hodnote pH 6 je vyvolané prvé štádium (pre-acid shock) zahŕňajúce syntézu núdzových pH homeostatických systémov, ktoré alkalizujú cytoplazmu počas obdobia, kedy je bunka vystavená extrémnemu acidickému stresu (pH 3). Druhé štádium (post-acid shock) nastáva, keď vonkajšie pH klesne pod 4,5. V tomto štádiu je indukovaných približne 50 acid shock proteínov (ASP), ktoré slúžia na prevenciu alebo opravu makromolekulárneho poškodenia. [17]

2.2.4.2 Cross-protection

Schopnosť jednej stresovej podmienky poskytnúť ochranu proti iným stresom sa nazýva cross-protection. Niekoľko štúdií preukázalo, že acidické adaptácie spôsobujú odolnosť voči širokej škále stresových podmienok vrátane tepla, solí, H_2O_2 , kryštálovej violeti či polymyxínu B. Avšak adaptácia na rozdielne stresy zvyčajne neindukuje významnú acidickú toleranciu. To znamená, že vystavenie sa kyseline môže byť baktériou vnímané ako ukazovateľ všeobecnejšieho stresu, zatiaľ čo teplo, soľ a H_2O_2 sú špecifickejšie stresové signály. [17]

2.2.5 Ťažké kovy

Pojem ťažké kovy sa používa pre označenie skupín kovov a polokovov, ktoré boli spojené s kontamináciou a potenciálnou toxicitou či ekotoxicitou. Ťažké kovy môžu byť klasifikované

ako esenciálne alebo neesenciálne podľa toho, akú majú biologickú funkciu pre mikroorganizmy. [18]

Ťažké kovy ako kobalt, meď, nikel a zinok sú pre bakteriálnu bunku v nanomolárnych koncentráciách esenciálne. Iné ťažké kovy, napr. olovo, kadmium, striebro nepatria medzi esenciálne prvky a nie je známa ani ich biologická funkcia. [1]

Atómy týchto prvkov obsahujú nespárený elektrón (okrem zinku), a preto sa môžu označiť ako radikály. Schopnosť prechodných kovov vyskytovať sa vo viacerých oxidačných stupňoch im umožňuje zúčastňovať sa mnohých oxidačno-redukčných reakcií, ale na druhej strane môžu redukčnými reakciami tvoriť vysoko toxický hydroxylový radikál. [1]

Pri vyšších koncentráciách sú ťažké kovy pre mikroorganizmy veľmi toxické kvôli ich schopnosti denaturovať proteíny, zasahovať do funkcie enzýmov či poškodzovať membrány a tak si prokaryotické aj eukaryotické organizmy vytvárajú viaceré obranné mechanizmy voči ich škodlivému pôsobeniu. [19]

2.2.5.1 *Stresová odpoveď na ťažké kovy*

Väčšina odolnosti voči kovom v baktérii je kódovaná génmi lokalizovanými na plazmidoch. Plazmidy môžu byť definované ako autonómne genetické elementy DNA, ktoré kódujú široké rozpätie funkcií v mnohých rôznych druhoch baktérií. [20]

Odpoveď baktérií na ťažké kovy zahŕňa expresiu celej sady génov. Exprimujú sa gény teplotného šoku, gény prislúchajúce SOS a oxidačnému stresovému regulónu. Napríklad kadmium je neesenciálny kov a s jeho toxicitou je spájaná produkcia reaktívnych metabolitov kyslíka, charakterizujúca oxidačný stres (ale pôsobenie kadmia nemusí vždy vyvolať rovnakú odozvu, akú vyvoláva oxidačný stres). Ióny Cd^{2+} môžu tiež nahradiť ióny zinku a železa v niektorých proteínoch, napr. v molekulách metaloenzýmov a proteínoch interagujúcich s DNA, čo má za následok ich inaktiváciu a uvoľnenie iónov generujúcich vysoko reaktívne hydroxylové radikály, ktoré potom následne poškadzujú molekuly DNA, proteínov a lipidov. Okrem toho, kadmium inhibuje replikáciu DNA a jeho účinkom sa stáva DNA citlivejšia na nukleázový útok, výsledkom čoho je poškodenie vlákien DNA. Všeobecne sú bunky baktérií schopné prispôbiť sa nízkej koncentrácii kadmia a po určitej dobe obnoviť svoj rast. [1]

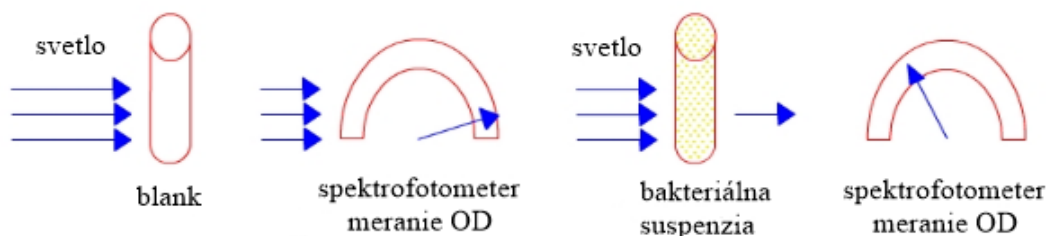
2.3 Rast baktérii

Rast bunky možno definovať ako prírastok bunecnej hmoty a veľkosti, pri ktorom sa syntetizujú rôzne makromolekuly, čo vedie následne k tvorbe novej organizovanej štruktúry. Jedná sa o jedinečnú charakteristiku všetkých organizmov ovplyvnenú fyzikálnymi a nutričnými faktormi. Fyzikálne faktory zahŕňajú hodnotu pH, osmotický či hydrostatický tlak, teplotu a obsah vlhkosti v prostredí, v ktorom organizmus rastie. Medzi nutričné faktory patrí množstvo uhlíka, dusíka, síry, fosforu a iných stopových prvkov poskytnutých v rastovom médiu. Keď baktéria dosiahne určitej veľkosti binárnym delením sa materská bunka rozdelí na dve dcérine, ktoré majú rovnaký rastový potenciál takže sa rastúca populácia zdvojnásobuje v pravidelných intervaloch. Čas, za ktorý dôjde k zdvojnásobeniu populácie sa nazýva generačná doba. [21], [22]

2.3.1 Rastová krivka

Dynamika rastu bakteriálnych populácií môže byť pozorovaná vynesением absorbancie alebo logaritmu počtu buniek v závislosti na čase inkubácie. Takto získaná krivka má sigmoidný tvar a nazýva sa rastová krivka. Zvýšenie bunecnej hmoty sa meria pomocou spektrofotometra,

ktorý zaznamenáva zákal alebo optickú hustotu (OD) ako faktor množstva svetla absorbovaného bakteriálnou suspenziou. Stupeň zákalu priamo súvisí s počtom prítomných mikroorganizmov, množstvo prechádzajúceho svetla zakaleným prostredím klesá, čo sa prejaví následným zvýšením absorbancie (Obrázok 4). Táto metóda merania rýchlosti rastu buniek sa využíva hlavne kvôli svojej pohodlnosti a rýchlosti. [21]

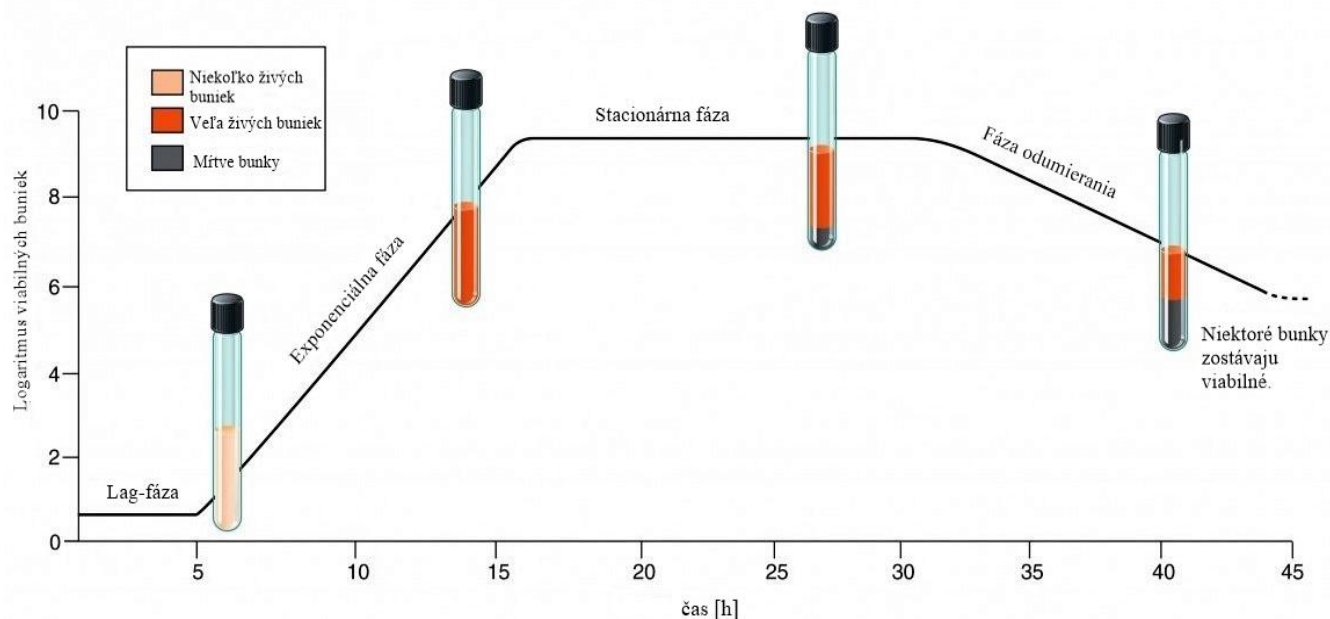


Obrázok 4: Schéma merania optickej hustoty bakteriálnej suspenzie [21]

Rastová krivka zahŕňa štyri rôzne fázy (Obrázok 5):

1. **Lag-fáza** – obdobie, kedy sa bunky prispôbujú novému prostrediu a pripravujú sa na bunčné delenie. Bunky sa zväčšujú, ale nie sú schopné replikácie a tak nedochádza k výraznému nárastu ich počtu. Dĺžka lag-fázy priamo závisí na predchádzajúcom stave organizmu. Ak sa organizmus rastúci v médiu bohatom na živiny naočkuje do nutrične chudobnejšieho prostredia, adaptácia na toto nové prostredie mu zaberie viac času. Organizmus začne syntetizovať nevyhnutné proteíny, koenzýmy a vitamíny potrebné pre svoj rast a teda dôjde k následnému nárastu v lag-fáze. Naopak v prípade, keď je organizmus z nutrične chudobnejšieho média prenesený na bohatšie médium, rýchlo sa prispôbi tejto zmene a spustí sa delenie bez akéhokoľvek oneskorenia, a preto môže lag-fáza v krivke úplne chýbať. [21], [22]
2. **Exponenciálna (logaritmická fáza)** – kultúra dosahuje maximálnu a konštantnú rýchlosť rastu a počet buniek rastie s časom exponenciálne. V tejto fáze sa tiež dá vypočítať generačná doba, keďže sa počet buniek neustále zdvojnásobuje. Hodnota generačnej doby sa mení s rôznymi organizmami. Napríklad *E. coli* sa delí každých 20 minút, preto je jej generačná doba 20 minút a u *Staphylococcus aureus* je to zas 30 minút. [21], [22]
3. **Stacionárna fáza** – populácia rastie, čím sa znižuje koncentrácia živín a zvyšuje koncentrácia metabolitov. To vyústi do hromadeniu odpadu, toxických metabolitov a inhibičných zlúčenín. Začnú sa meniť podmienky média ako je teplota či pH, a tým sa vytvára nepriaznivé prostredie pre rast baktérií. V určitom bode sa počet nových buniek rovná počtu mŕtvych, bunky ktoré zaniknú sú nahradené novými v približne rovnakom počte. Behom tejto fáze sa tvoria endospóry. [21], [22]
4. **Fáza odumierania (poklesu)** – vyčerpanie živín a nahromadenie toxických produktov metabolismu v médiu vedie k zrýchľujúcemu sa úbytku buniek. Počas tejto fáze baktéria úplne stráca schopnosť reprodukcie a počet mŕtvych buniek začne prevládať nad počtom živých. Niektoré organizmy sú voči tejto podmienke odolné a prežívajú

pomocou tvorby endospór. Môže trvať rôzne dlho v rozmedzí týždňov až mesiacov. [21], [22]



Obrázok 5: Jednotlivé fázy rastu baktérií [22]

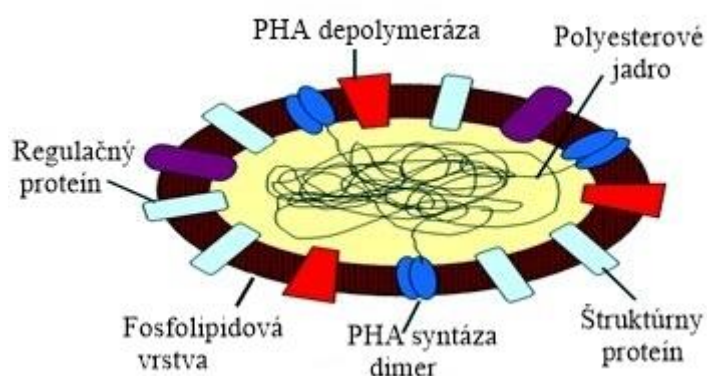
2.4 Biofilm bakteriálnych monokultúr a zmiešaných kultúr

Baktérie sa vyskytujú v prírode prevažne v podobe biofilmov, ktorých tvorba je spojená so zvýšenou toleranciou baktérií k celej rade stresorov a vyskytuje sa tiež v odozve na regulačné procesy vrátane „quorum sensingu“ (medzibunečná komunikácia, ktorá mikroorganizmom umožňuje detekovať a reagovať na populačnú hustotu) alebo pri vystavení stresorom ako sú subletálne dávky antibiotík a detergentov. Biofilmy sú v podstate mikrobiálnym spoločenstvom, ktoré môže tvoriť jeden a častejšie aj viac druhov z domén Bacteria a Archaea. Jednou z ich charakteristických čŕt je prítomnosť samoprodukovanej extracelulárnej matrix. Táto matrix poskytuje scaffold pre adhéziu k povrchom a kohéziu medzi bunkami a taktiež chráni pred vonkajšími škodlivými vplyvmi ako je vysušenie, oxidačné činidlá, antibiotiká a imunitný systém človeka. Matrix typicky pozostáva z kombinácie proteínov, extracelulárnej DNA a polysacharidov. V prírode je väčšina biofilmov zastúpená rôznymi druhmi baktérií častejšie než populáciou len jedného druhu. U týchto druhov biofilmov tvorených rôznymi druhmi, organizácia rozličných druhov môže byť dôležitá pre funkciu kultúry, a preto zohráva matrix veľmi dôležitú úlohu v štruktúrnej organizácii zmiešaných kultúr. Taktiež zmiešané biofilmy preukázali ochranu pred stresom na úrovni komunity rozšírenú medzi všetkými členmi, hoci niektoré druhy z tejto komunity boli veľmi citlivé na daný stres. Mechanizmus tohto je v súčasnosti ešte neznámy, avšak je známe, že zloženie zmiešaných biofilmov je silne ovplyvnené schopnosťou baktérie tvoriť špecifické polysacharidy. Napríklad *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produkuje tri polysacharidy a to alginát, Psl a Pel pri tvorbe biofilmu monokultúry. Pri tvorbe zmiešaného biofilmu obsahujúceho kultúry *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens*, a *Klebsiella pneumoniae* mala strata Psl polysacharidu najväčší dopad na integráciu *Pseudomonas aeruginosa*, naopak strata Pel nemala žiadny vplyv na vývoj biofilmu zmiešaných kultúr. Biofilm pozostávajúci z dvoch kultúr, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*, nebol ovplyvnený stratou žiadneho zo spomínaných polysacharidov,

zatiaľ čo slizovitý kmeň *Pseudomonas aeruginosa* dosiahol väčšej biomasy než jeho základný kmeň. Ďalej zmiešaný biofilm tvorený tromi druhmi preukázal zvýšenú stresovú odolnosť voči antibiotikám, SDS oproti biofilmu tvorenému len jedným druhom. [23]

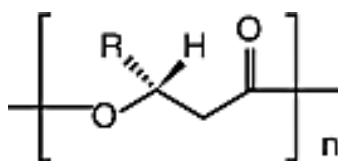
2.5 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú polyester zložené z hydroxymastných kyselín a predstavujú komplexnú triedu polymérov intracelulárne syntetizovaných rôznymi gramnegatívnymi či grampozitívnymi baktériami a Archaea. PHA sú syntetizované a akumulované v prítomnosti nadbytku zdroja uhlíka, zatiaľ čo rast je inhibovaný v dôsledku obmedzenej dostupnosti živín. PHA sú uložené ako vo vode nerozpustné inklúzie v cytoplazme buniek a v čase uhlíkového hladovania sú degradované enzýmami a následne slúžia ako zdroj uhlíka a energie ku metabolickým pochodom. Tieto sférické inklúzie sú tvorené polyesterovým jadrom obklopeným fosfolipidovou vrstvou s vnorenými proteínmi (Obrázok 6) a môžu zaberať až 90% obsahu bunky. Molekulová hmotnosť polymérov sa pohybuje v rozmedzí od $2 \cdot 10^5$ až $3 \cdot 10^6$ daltonov, v závislosti na mikroorganizme a kultivačných podmienkach. [24], [25]



Obrázok 6: Štruktúra PHA inklúzie [26]

V týchto polyméroch tvorí karboxylová skupina jedného monoméru esterovú väzbu s hydroxylovou skupinou susedného monoméru (Obrázok 7). [27]



Obrázok 7: Poly(3-hydroxyalkanoáty) [28]

Tabuľka 1: PHA a najbežnejšie R-skupiny [28]

R-skupina	Celý názov	Skratka
CH ₃	Poly(3-hydroxybutyrát)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poly(3-hydroxyvalerát)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poly(3-hydroxyhexanoát)	PHHx

Jedným z najbežnejších a najviac charakterizovaných PHA je poly(3-hydroxybutyrát) [P(3HB)], ktorý je syntetizovaný z 3-hydroxybutyrátu (3HB), pričom rôzne baktérie používajú hydroxymastné kyseliny s rôznou dĺžkou reťazca, generujú radu PHAs. [29]

Kopolyméry P(3HB) môžu vznikať zo substrátov a môžu viesť k tvorbe polymérov obsahujúcich monomér 3-hydroxyvalerát (3HV) alebo 4-hydroxybutyrát (4HB). Dokopy tvoria polyméry obsahujúce tieto monoméry o dĺžke reťazca 3-5 atómov uhlíka skupinu PHA, ktorá sa označuje ako short-side-chain PHA (ssc-PHA). Naproti tomu medium-side-chain (msc - PHA) sú zložené z C₆ až C₁₆ 3-hydroxymastných kyselín. Drvivá väčšina mikróbov syntetizuje buď ssc-PHA obsahujúce hlavne 3HB jednotky alebo msc-PHA obsahujúce 3 - hydroxyoktanoát (3HO) a 3-hydroxydekanoát (3HD) ako hlavné monoméry. [27]

2.5.1 Fyzikálne vlastnosti

Baktériami produkované P(3HB) a ďalšie PHA majú dostatočne vysokú molekulovú hmotnosť na to, aby mali polymérové charakteristiky podobné konvenčným plastom ako je napr. polypropylén (Tabuľka 2) . V bunke sa P(3HB) nachádza v kvapalnom stave. Avšak po extrakcii z bunky s organickými rozpúšťadlami sa stáva P(3HB) vysoko kryštalický a v tomto stave je tvrdý, ale krehký materiál. Vzhľadom k jeho krehkosti nie je P(3HB) príliš rezistentný voči stresu. Taktiež relatívne vysoká hodnota teploty topenia (okolo 170 °C) je blízka teplote, pri ktorej sa polymér vplyvom tepla rozkladá a tým sa obmedzuje možnosť spracovávať tento homopolymér. [27]

Tabuľka 2: Vlastnosti PHA a polypropylénu [27]

Parameter	Hodnota pre ^a :				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	PP
T _m (°C)	177	145	150	61	176
T _g (°C)	2	-1	-7	-36	-10
Kryštalinita (%)	70	56	45	30	60

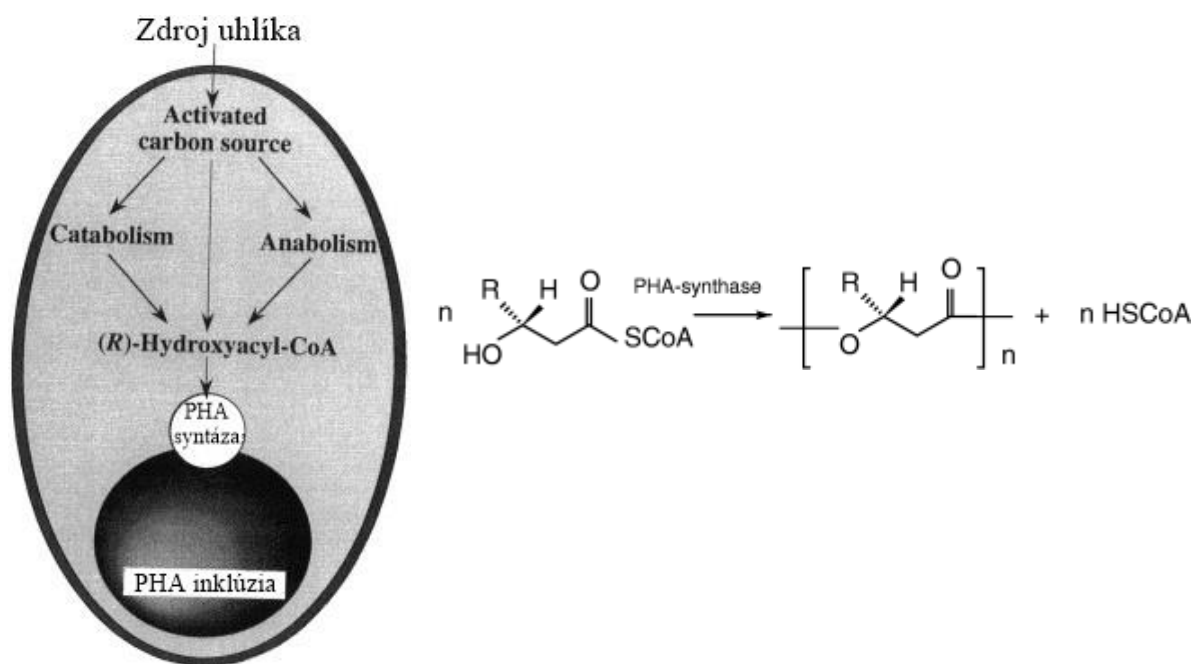
^a P (3HB) je poly (3-hydroxybutyrát), P (3HB-3HV) je poly (3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) obsahujúci 20% 3HV, P(3HB-4HB) je poly (3-hydroxybutyrát-co-4 hydroxybutyrát) s obsahom 16% 4HB, P(3HO-3HH) je poly (3-hydroxyoktanoát-co-3-hydroxyhexanoát) s obsahom 11% 3HH a PP je polypropylén.

Začlenenie 3HV do P(3HB) vedie k poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) [P(3HB - 3HV)] kopolyméru, ktorý je menej tvrdý a krehký než P(3HB) a ktorý môže byť použitý pre prípravu filmov s vynikajúcou nepriepustnosťou pre vodu a plyn podobnou polypropylénu a môže byť spracovaný pri nižšej teplote, pričom si zanechá väčšinu ostatných vynikajúcich mechanických vlastností P(3HB). Na rozdiel od P(3HB) a P(3HB-3HV), msc-PHA majú omnoho nižší stupeň kryštalinity a sú viac elastické, a preto majú potenciálne odlišný rozsah aplikácií oproti ssc-PHA. [27]

2.5.2 Biosyntéza PHA

V baktériách môžu byť rozlišované tri metabolické fázy biosyntézy PHA. Za prvé, zdroj uhlíka vhodný pre biosyntézu PHA musí z prostredia vstúpiť do bunky. To je dosiahnuteľné buď pomocou špecifického transportného systému lokalizovaného v cytoplazmatickej membráne, alebo difúziou zlúčeniny do bunky. Za druhé, anabolické alebo katabolické reakcie

- alebo oboje - premenia zlúčeniny na hydroxyacyl koenzým A thioester, ktorý je substrát z PHA syntázy. Za tretie, PHA syntáza, ktorá je kľúčovým enzýmom biosyntézy PHA, použije tieto thioestery ako substráty a katalyzuje tvorbu esterovej väzby so súčasným uvoľnením koenzýmu A (Obrázok 8). Druhá fáza je najdôležitejšia, pretože počas nej je zdroj uhlíka prevedený na vhodný substrát pre PHA syntázu. PHA syntáza vykazuje širokú substrátovú špecificitu, a preto môže byť polymerizovaná široká škála monomérov. Jedným z faktorov, ktoré určujú typ PHA zložiek je zdroj uhlíka ako sú jednoduché cukry či mastné kyseliny (Obrázok 8). [30]



Obrázok 8: Všeobecné schéma metabolických dráh syntézy PHA z rôznych zdrojov uhlíka v bakteriálnej bunke (vľavo) [31], Syntéza PHA použitím hydroxyacyl-CoA thioesterov ako prekursoru (vpravo) [28]

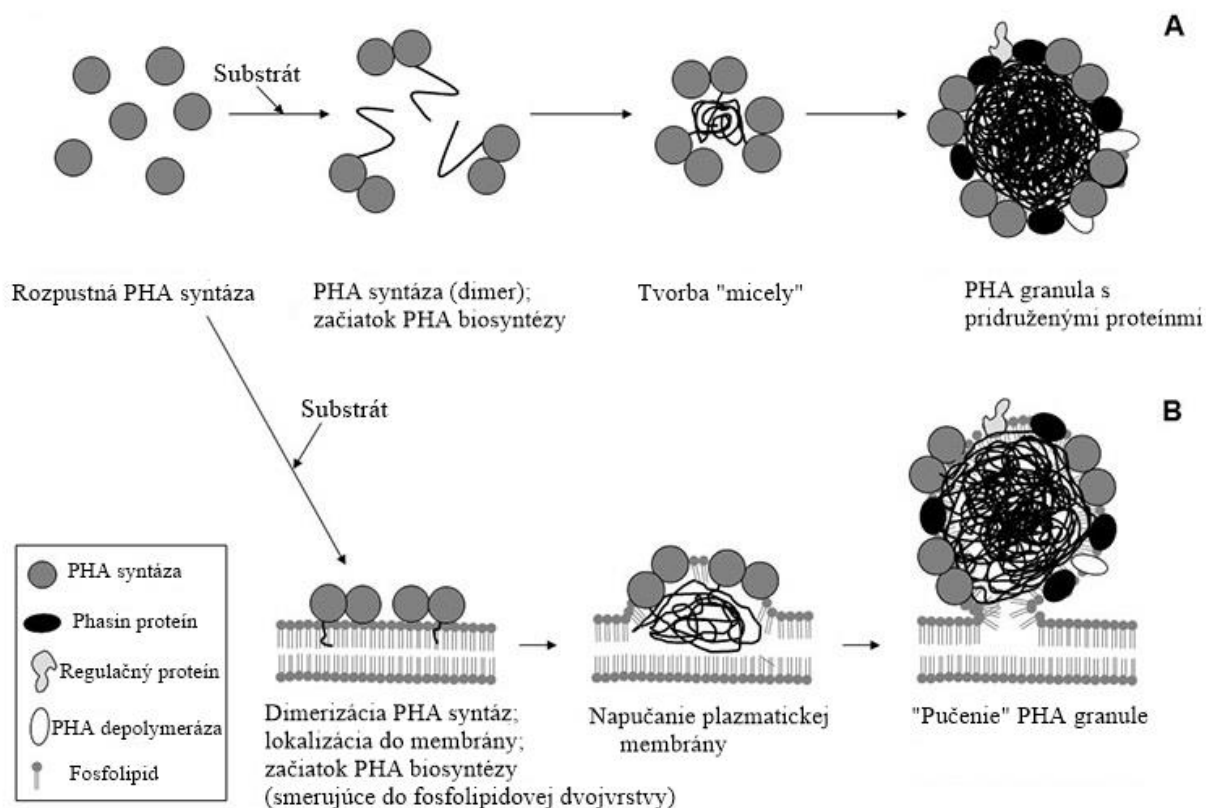
2.5.3 Tvorba granulí in vivo

V súčasnosti sú diskutované dva modely zostavenia PHA granúl in vivo (Obrázok 9). Prvým z nich je "micelárny" model, ktorý je založený na predpoklade, že PHA syntáza je prítomná v bunke ako rozpustný enzým, viac alebo menej náhodne distribuovaný v cytoplazme. Akonáhle začne polymerizácia, vznikajúci polyesterový reťazec prevedie pôvodne rozpustný enzým na amfipatickú molekulu a stále viac sa stávajúce hydrofóbne reťazce PHA agregujú do štruktúry podobnej micely. V tomto modeli, sa zložky hraničnej vrstvy ako fosfolipidy a proteíny pripojené na granuli, na rozdiel od syntázy, postupne stávajú súčasťou samoorganizujúcej sa zväčšujúcej PHA inklúzie. [29]

Druhý model je "pučiaci", ktorý naznačuje, že PHA syntáza je lokalizovaná na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány, a to buď zo svojej podstaty alebo akonáhle sa PHA reťazec vynorí z enzýmu. V tomto prípade, biosyntéza polyesteru bude smerovať do medzimembránového priestoru, hydrofóbneho priestoru medzi fosfolipidovými vrstvami, kde sa rozširujúce reťazce budú hromadiť, až nakoniec PHA inklúzia obklopená fosfolipidovou monovrstvou vypučí mimo membránu. Zatiaľ čo "micelárny" model je podporovaný

skutočnosťou, že PHA granule môžu byť vyrobené in vitro v neprítomnosti membrán, väčšina z nedávno vzniknutých dôkazov je v prospech "pučiaceho" modelu. [29]

Výhodou je že, polymerizáciou rozpustných medziproduktov na nerozpustné molekuly bunka nepodlieha zmenám jej osmotického stavu a nedochádza ani k úniku dôležitých živín von z bunky. [27]



Obrázok 9: Modely tvorby PHA granúl: A) "micelárny" model B) "pučiacy" model [32]

2.5.3.1 Baktéria *Cupriavidus necator*

Ralstonia Eutropha je gramnegatívna fakultatívne chemoliatotrofná baktéria schopná rásť s organickými substrátmi alebo v ich neprítomnosti s H_2 a CO_2 za aeróbných podmienok a vyskytujúca sa v pôde a sladkovodnom prostredí. Keď dôjde k obmedzeniu živín, začne táto baktéria riadiť väčšinu svojho zníženého uhlíkového toku k syntéze PHB. Pri kultivácii s H_2 a CO_2 je *Ralstonia eutropha* schopná tvoriť až 61g/l PHB v priebehu 48 hodín, čo predstavuje asi 70% celkovej hmotnosti bunky. [33], [34]

V minulosti bola baktéria niekoľkokrát premenovaná na *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* či *Wautersia eutropha*, čiastočne kvôli schopnosti využívať veľa rôznych zlúčenín ako zdroj energie a uhlíka. Súčasný oficiálny názov organizmu je *Cupriavidus necator*, čo je výsledok porovnania genómovej sekvencie s ostatnými *Cupriavidus necator* kmeňmi. Avšak mnoho výskumníkov sa rozhodlo naďalej používať názov *Ralstonia eutropha* v záujme zachovania kontinuity. [33]

Za posledné tri desaťročia je *Ralstonia eutropha* na celom svete skúmaná ako modelový organizmus priemyselnej výroby polyhydroxyalkanoátov a práve preto bola táto baktéria použitá v experimentálnej časti práce (3.1.1). [33] Taktiež je využívaná pre svoju schopnosť

rozkladať veľké množstvo chlórovaných arómatov a chemicky príbuzných zlúčenín pre procesy bioremediácie. [35]

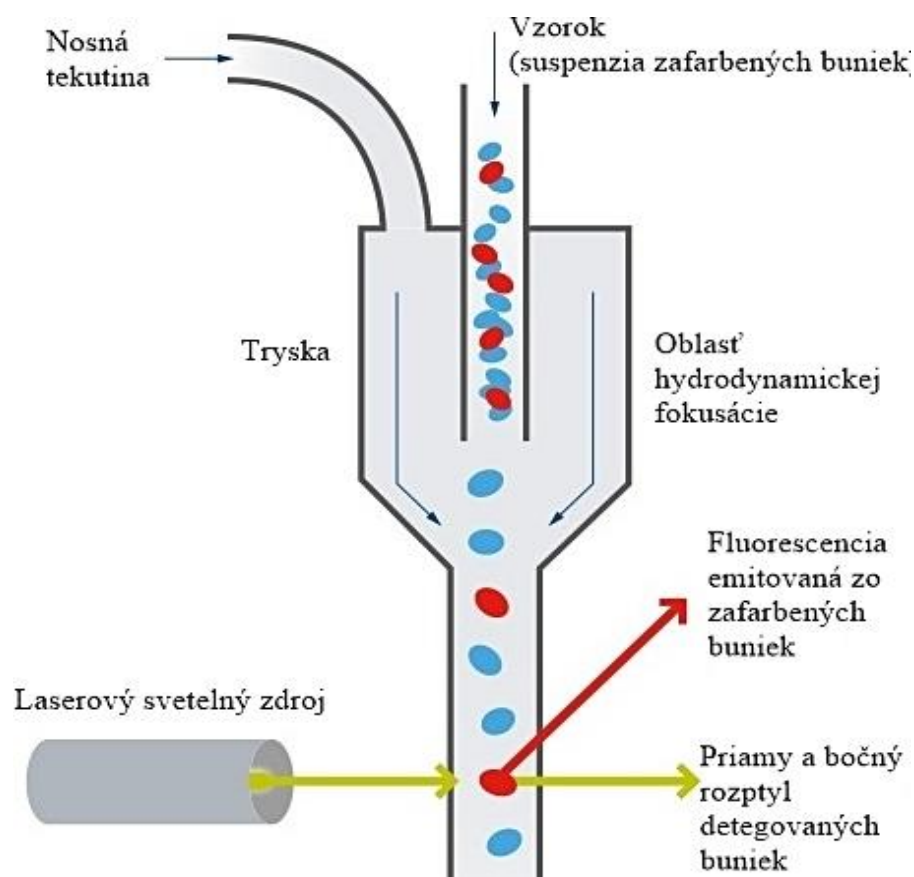
2.6 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je všeobecná metóda slúžiaca k rýchlej analýze vlastností veľkého množstva buniek na úrovni jednej bunky pomocou svetelného rozptylu, fluorescencie a merania absorpcie. Rýchlosť analýzy môže dosiahnuť hodnotu až tisíc buniek za sekundu. Výhoda tejto techniky spočíva v širokom rozsahu bunečných parametrov, ktoré môžu byť určené a v schopnosti získať informácie o tom, ako sú tieto vlastnosti distribuované v heterogénnej populácii buniek. Prietoková cytometria teda umožňuje nielen kvalitatívne, ale aj kvantitatívne spracovanie materiálu. [36], [37] V tejto práci bola prietoková cytometria využívaná na stanovenie viability buniek a k odlíšeniu percentuálneho zastúpenia jednotlivých buniek v heterogénnej populácii buniek (3.6).

Zastúpenie viabilných buniek v populácii je jednou z kľúčových informácií využívaných k hodnoteniu fyziologického stavu kultúry, kontrole bioprocesu či jeho riadení, hodnotení kvality biomasy, biologických rizík atď. Aj keď existuje veľa spôsobov ako posúdiť viabilitu, tou najbežnejšou je detekcia membránovej integrity. Poškodenie membrány vedie ku strate intracelulárnych komponent ako sú proteíny a iné fluoreskujúce zložky. Integrita membrány môže byť detegovaná vylúčením alebo zadržaním farbiva. Vylúčením farbiva sa zafarbia nukleové kyseliny v bunkách s poškodenými membránami (zvyčajne považované za mŕtve bunky). Medzi často používané fluorescenčné farbivá patria interkalačné činidlá propidium jodid a ethidium bromid. [36]

2.6.1 Princíp prietokovej cytometrie

Keď suspenzia buniek vstúpi do prietokovej cely, častice sa náhodne rozdelia do priestoru, ktorého priemer je podstatne väčší než priemer väčšiny buniek. Vzorok je preto nutné zorganizovať do prúdu jednotlivých častíc, ktoré môžu byť potom jednotlivo detegované. Tento proces je riadený fluidným systémom, ktorý sa skladá z centrálného jadra, ktorým prechádza prúd vzorky obklopený nosnou (plášťovou) tekutinou. Vzhľadom k zúženiu plášťa (v tryske alebo kyvete) sa rýchlosť nosnej tekutiny zvyšuje a strháva so sebou bunky zo vzorku. To umožňuje vytvorenie prúdu jednotlivých buniek, čo sa nazýva hydrodynamická fokusácia (Obrázok 10). [38]



Obrázok 10: Hydrodynamická fokusácia [39]

V ideálnom prípade (laminárny tok) nedochádza k zmiešaniu prúdu vzorku s nosnou tekutinou. Po hydrodynamickej fokusácii bunky prechádzajú jedna bunka za druhou cez lúč emitovaný laserom. Zdroj svetla ožaruje bunku a svetlo sa potom môže rozptyľovať do všetkých smerov. Svetlo, ktoré je rozptýlené do priameho smeru po interakcii s bunkou v uhle až do 20° od dopadajúceho lúča lasera udáva informáciu o relatívnej veľkosti bunky (priamy rozptyl svetla FCS). Svetlo merané pri 90° k budiacemu zdroju (bočný rozptyl svetla SSC) vypovedá o granulovitosti bunky. Bunky sa tiež môžu zafarbiť špecifickým fluorescenčným farbivom a pri absorpcii svetelnej energie budú fluorochromy farbív emitovať svetlo, ktoré sa zachytí optickým systémom a dôjde až k detektorom. Fotonásobiče (PMTs) sú najčastejšie využívaným detektorom. Signál je potom zosilnený a vyhodnotený počítačom. [38]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

3.1.1 Použité baktérie

V tejto práci boli používané dva bakteriálne kmene, a to *Cupriavidus necator* H16 so zbierkovým číslom CCM 3726 a mutantný kmeň *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 so zbierkovým číslom DSM 541. Kmeň *Cupriavidus necator* H16 bol získaný z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne. Kmeň *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4 bol zakúpený z Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

3.1.2 Použité chemikálie

- ♦ Nutrient Broth (HiMedia)
- ♦ Agar Powder (HiMedia)
- ♦ Propidium jodid (eBioscience)
- ♦ Nilska červeň (Sigma-Aldrich)
- ♦ Kopolymer P(3HB-co-3HV) (PHBV, 12 % mol. PHV) (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Použité prístroje

- ♦ Prietokový cytometer, Apogee A50, Apogee Flow Systems
- ♦ Plynový chromatograf: GC-FID detektor (Hewlett Packard, Series II 5890)
Kolóna DB-WAX 30 m by 0,25 mm, Agilent Technologies
Kolóna ZB-WAXplus 30 m by 0,32 mm, Zebron
- ♦ Predvážky, Kern EW 620-3NM
- ♦ Analytické váhy, Boeco
- ♦ Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments
- ♦ Centrifuga, Boeco
- ♦ Mikrocentrifuga, Sigma 1-14
- ♦ Temperovaná trepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom s.r.o
- ♦ Temperovaná trepačka, Orbital shaker-Incubator ES-20, Biosan
- ♦ Termostat, LS-35
- ♦ Termostat blokový, Stuart SBH 200D
- ♦ Spektrofotometer, Biotech Implen
- ♦ Vortex, TK3S, Tecno Kartell
- ♦ Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.2 Kultivácia baktérií

3.2.1 Príprava inokula

Pre kultiváciu bolo inokulum pripravované v 100 ml Erlenmayerových bankách s 50 ml živného média Nutrient Broth. Inokulum bolo zaočkované bakteriologickou kľučkou z agarovej misky a následne kultivované 24 hodín na temperovanej trepačke o teplote 30 °C. Po kultivácii bolo inokulum preočkované do minerálneho média, do ktorého sa pridávalo 10 % objemu inokula a pri kokultivácii 5 % objemu inokula *Cupriavidus necator* H16 a 5 % objemu inokula *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4. Pripravené média boli vždy autoklávované pri podmienkach 121 °C po dobu 20 minút, pričom fruktosa a roztok stopových prvkov boli

autoklávované pri 115 °C po dobu 20 minút a pridávali sa do produkčného média až po jeho sterilácii.

Analýza monokultúr a zmiešanej kultúry bola prevádzaná po rôznu dobu kultivácie a pri rozličných podmienkach teplôt a koncentráciach soli NaCl.

3.2.2 Živné médiá

Tabuľka 3: Zloženie živného média Nutrient Broth

Látka	Množstvo
Beef extract	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
destilovaná voda	1000 ml

Tabuľka 4: Zloženie minerálneho média, ktoré bolo použité za účelom produkcie PHA

Látka	Množstvo
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
MgSO ₄	0,2 g
Fruktosa	20 g
Roztok stopových prvkov*	1 ml
destilovaná voda	1000 ml

*Roztok stopových prvkov:

- ♦ FeCl₃ 9,7 g
- ♦ CaCl₂ 7,8 g
- ♦ CuSO₄ 0,156 g
- ♦ CoCl₂ 0,119 g
- ♦ NiCl₂ 0,118 g
- ♦ CrCl₂ 0,062 g
- ♦ 0,1 M HCl 1000 ml

3.3 Stanovenie biomasy

3.3.1 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy

Tento spôsob stanovenia je založený na meraní intenzity zákalu tekutého živného média, ktoré prebiehalo na spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 630 nm. Vzorky boli nariadené destilovanou vodou, tak aby sa hodnota absorbancie nachádzala v rozmedzí 0,2-1,0; pričom destilovaná voda bola použitá aj ako blank. Následne po dosadení nameraných absorbancií do regresnej rovnice bol stanovený obsah biomasy v g/l roztoku.

3.3.2 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy

Pre gravimetrické stanovenie obsahu biomasy bolo zo suspenzie baktérií odobraté 10 ml do predom zvaženej centrifugačnej skúmavky. Vzorky v skúmavke boli stáčané v centrifuge po

dobu 5 minút pri 6000 ot/min, následne bol supernatant vyliaty a sediment bol sušený v termostate pri 72 °C až do dosiahnutia konštantnej hmotnosti.

3.4 Stanovenie obsahu PHB v biomase

Obsah polyhydroxyalkanoátov v biomase *Cupriavidus necator* H16 bol zisťovaný plynovou chromatografiou s FID detektorom. Suspenzia buniek o objeme 10 ml bola stočená na centrifuge po dobu 5 minút pri 6000 ot/min, supernatant bol odliaty a sediment sušený do konštantnej hmotnosti v termostate pri teplote 72 °C. Následne bolo navážených približne 10 mg vysušenej biomasy do vialiek, ku ktorým bolo pridané 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % obj. kyseliny sírovej v methanole s nízkym obsahom kyseliny benzoovej (5 mg/ml) ako interného štandardu. Zmes bola umiestnená do blokového termostatu o teplote 94 °C po dobu 3 hodín a po prebehnuter esterifikácii bola extrahovaná v 0,5 ml 0,05 M NaOH. Po ustálení fázového rozhrania bolo 50 µl spodnej chloroformovej fáze odpipetované do novej vialky s obsahom 950 µl chloroformu. Vialky boli uzavreté a použité pre meranie na plynovom chromatografi.

Paralelne bola pripravovaná aj rada kalibračných roztokov rovnakým spôsobom s kopolymerom PHBV obsahujúcim 88 % 3-hydroxybutyrátu a 12 % 3-hydroxyvalerátu (Príloha - Obrázok 18). Potom sa pomocou pomeru píkov pripravenej a zmeranej rady kalibračných roztokov o známej koncentrácii zhotovila kalibračná priamka (Príloha – Graf 23), z ktorej sa následne určil obsah PHB v biomase v závislosti na teplote a koncentrácii soli so stúpajúcim časom pri kultivácii a kokultivácii.

3.5 Stanovenie viability výsevom

Vzorky kultúr oboch kmeňov boli nariadené fyziologickým roztokom desiatkovým riedením až do zriedenia 10^{-7} a následne bol objem 10 µl z každého riedenia rozotrený sterilnou hokejkou paralelne na dve agarové misky, ktoré boli umiestnené do termostatu. Po inkubácii bol na miskách s počítateľným množstvom kolónií (50-200) určený ich priemerný počet z dvoch paralelných stanovení, ktorý bol následne vynásobený zriedením suspenzie a prepočítaný na 1 ml, čím sa získal počet kolónií tvoriacich jednotky (KTJ) v 1 ml pôvodnej kultúry. Toto stanovenie bolo použité len pri teplotnom strese.

3.6 Stanovenia s využitím prietokovej cytometrie

V priebehu kultivácie monokultúr oboch používaných kmeňov a zmiešanej kultúry týchto kmeňov bola stanovovaná viabilita pomocou prietokového cytometra pri rôznych teplotách a koncentraciách soli a tiež zastúpenie buniek jednotlivých kmeňov v heterogénnej bunečnej suspenzii.

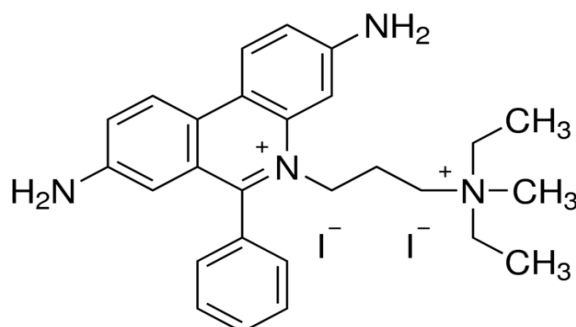
3.6.1 Stanovenie viability s použitím propidium jodidu

Zo suspenzie buniek bolo odobrané 0,1 ml a pridané do vialky typu Eppendorf s obsahom 0,9 ml PBS pufri (Tabuľka 5). Zmes bola odstredená v mikrocetrifuge po dobu 5 minút pri 10 500 ot/min, supernatant bol odliaty a sediment resuspendovaný znova v PBS pufri. Zmes bola opäť odstredená pri rovnakých podmienkach, supernatant odliaty a sediment resuspendovaný v PBS pufri a ku takto zhotovenej suspenzii buniek bolo pridaných 5 µl propidium jodidu

(2 mg/ml). Následne sa zmes ponechala 15 minút v tme a nasledovalo meranie viability na prietokovom cytometri.

Tabuľka 5: Zloženie PBS pufru

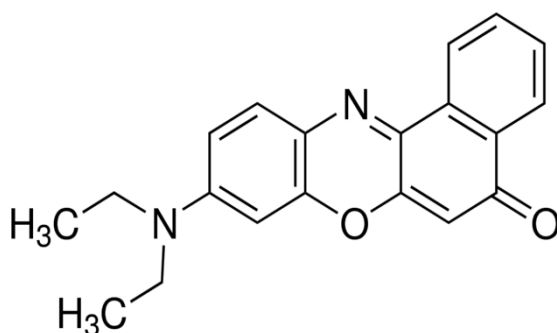
Látka	Množstvo [g/l destilovanej vody]
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	3,5814
KH ₂ PO ₄	0,2450
NaCl	8,0067
KCl	0,2013



Obrázok 11: Štruktúra propidium jodidu [40]

3.6.2 Stanovenie zastúpenia buniek pomocou Nilskej červene

Zo suspenzie baktérií zmiešanej kultúry bolo odobraté 0,2 ml a pridané do vialky typu Eppendorf s obsahom 0,8 ml PBS pufru (Tabuľka 5) (tiež sa odobrali vzorky samostatných kultúr kmeňov pred kokultiváciou, ktoré slúžili na priradenie miesta signálu každého kmeňa v zmiešanej kultúre). Roztok bol centrifugovaný po dobu 2 minút pri 10 000 ot/min, supernatant vyliaty a sediment resuspendovaný v 1 ml PBS pufru. Zmes bola opätovne scentrifugovaná, supernatant odliaty a bol pridaný 1 ml 20 % ľadového ethanolu, pričom sa suspenzia ponechala 10 minút v chladničke, aby mohla prebehnúť permeabilizácia bunecných membrán ethanolom, ktorá umožnila prienik farbiva do buniek. Následne sa suspenzia scentrifugovala, supernatant bol vyliaty a sediment resuspendovaný v PBS pufri. Centrifugácia sa zopakovala ešte posledný raz, supernatant bol odliaty a zvyšný sediment resuspendovaný v PBS pufri. Do takto pripravenej bakteriálnej suspenzie sa pridalo 5 µl Nilskej červene (1 mg/ml), suspenzia sa ponechala 15 minút v tme a nasledovalo meranie na prietokovom cytometri. Ako excitačný zdroj pri analýze prietokovým cytometrom bol použitý laser o vlnovej dĺžke 488 nm a fluorescencia Nilskej červene bola detegovaná v kanáli FL2.



Obrázok 12: Štruktúra Nilskej červene [41]

4 VÝSLEDKY A DISKUSIE

4.1 Vplyv teplotného stresu

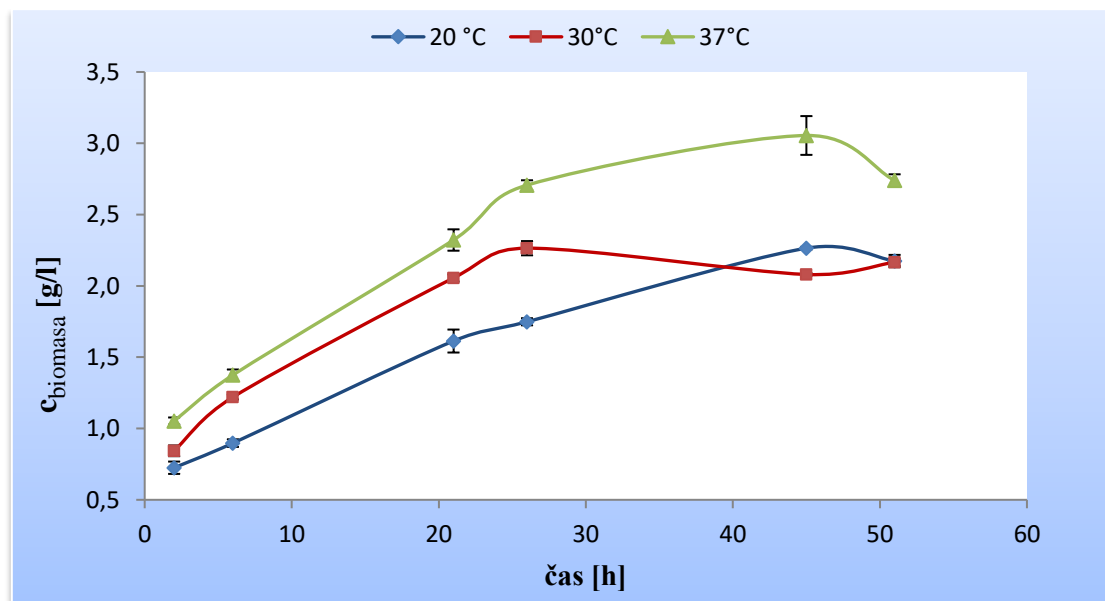
V tomto experimente sa skúmal vplyv teplotného stresu v priebehu troch dní počas kultivácie na vybrané kmene *Cupriavidus necator* H16 a *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻4. V priebehu kultivácie boli suspenzie baktérií inkubované v temperovaných trepačkách pri teplote 20 °C, 30 °C a 37 °C a v rôznych časových úsekoch boli odoberané vzorky pre stanovenie biomasy, obsahu PHB v biomase, viability buniek prietokovou cytometriou a výsevom.

4.1.1 Stanovenie biomasy spektrofotometricky

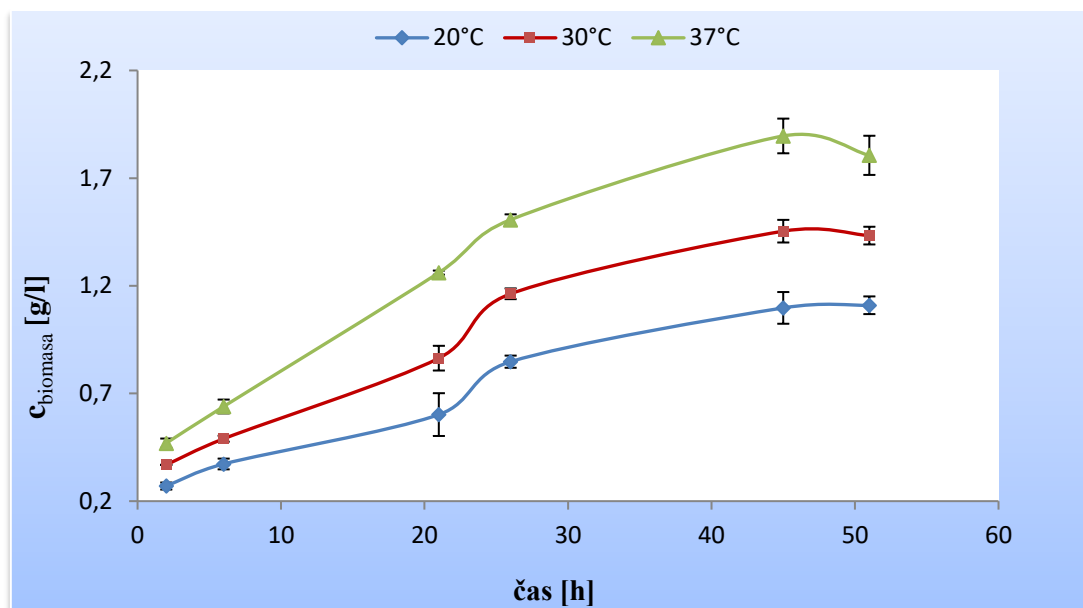
Pre stanovenie koncentrácie biomasy v priebehu kultivácie pri každej teplote v NB médiu bola použitá kalibračná krivka z bakalárskej práce, ktorá bola meraná na rovnakom prístrojovom vybavení. Po dosadení priemeru absorbancií do priamky bol stanovený obsah biomasy v g/l a zostrojené rastové krivky pre jednotlivé kmene. Následne boli preložené prvé tri body každej krivky priamkou a z regresnej rovnice bola odčítaná smernica priamky, ktorá vypovedá o rastovej rýchlosti buniek - η (Príloha - Graf 24 a Graf 25). Ďalej bola zmena rastovej rýchlosti za rôznych teplôt vyjadrená v %, kedy sa za 100 % považovala smernica priamky pri 30 °C, ktorá bola potom porovnaná so smernicami zvyšných dvoch teplôt.

Tabuľka 6: Porovnanie rastovej rýchlosti a jej zmeny pre jednotlivé kmene pri troch rôznych teplotách

	<i>C. necator</i> H16			<i>C. necator</i> H16/PHB ⁻ 4		
Parameter/t [°C]	20 °C	30 °C	37 °C	20 °C	30 °C	37 °C
η [h ⁻¹]	0,0470	0,0616	0,0658	0,0169	0,0258	0,0416
Zmena rastovej rýchlosti [%]	76	100	107	66	100	160



Graf 1: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16 pri rôznych teplotách



Graf 2: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16/PHB-4 pri rôznych teplotách

Zaujímavosťou pri tomto experimente je, že pre oba kmene vyšla najvyššia rastová rýchlosť pri 37 °C (Tabuľka 6), keďže obecné ako optimálna teplota rastu týchto kmeňov udáva 30 °C. U oboch kmeňov a pri všetkých teplotách sa v priebehu kultivácie až do 51. hodiny zvyšovala koncentrácia biomasy. Potom po 51. hodine kultivácie sa u kmeňa *C. necator* H16 pri teplotách 20 °C a 37 °C znížil obsah biomasy a u kmeňa *C. necator* H16/PHB-4 sa znížil pri 30 a 37 °C. Po tejto hodine pravdepodobne nastala fáza odumierania, kedy baktérie už vyčerpali zdroj uhlíka z média.

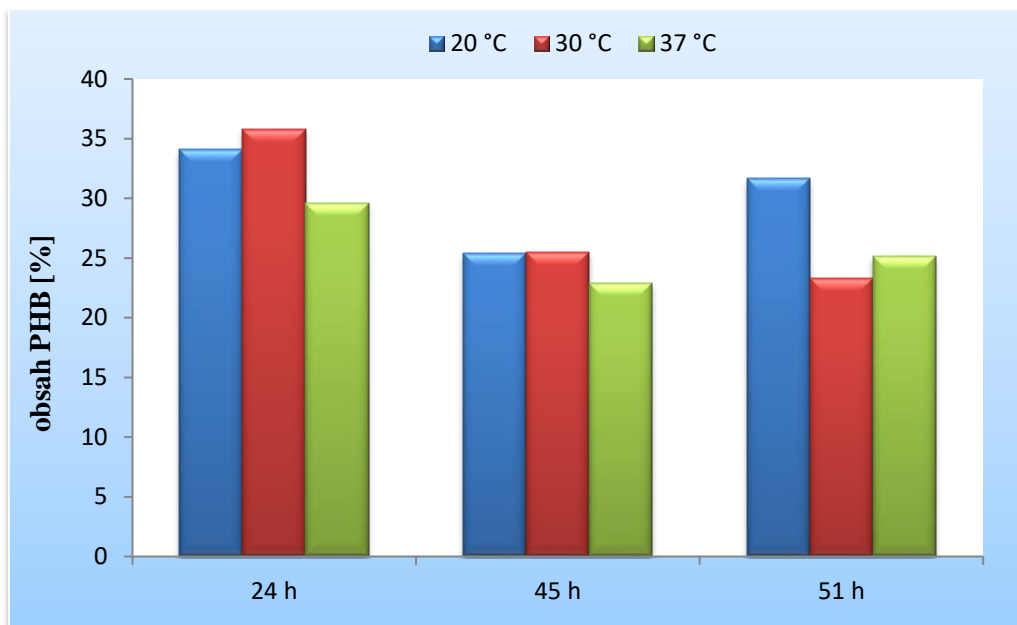
Ďalej možno z Tabuľka 6, Graf 1 Graf 2 pozorovať rovnaký trend, kedy pri teplote 37 °C počas celej doby kultivácie bol zaznamenaný najväčší obsah biomasy a naopak pri 20 °C najmenší. Obsah maximálneho množstva biomasy u kmeňa *C. necator* H16 dosiahol hodnotu 3,0546 g/l pri 37 °C a u kmeňa *C. necator* H16/PHB-4 1,8958 g/l taktiež pri teplote 37 °C. Ďalšou pozorovanou skutočnosťou je, že pri všetkých teplotách bolo množstvo biomasy vždy väčšie u kmeňa *C. necator* H16.

4.1.2 Stanovenie obsahu PHB v biomase

Biomasa bola odoberaná po 24 h, 45 h a 51 h kultivácie vždy u kmeňa *Cupriavidus necator* H16, pretože iba ten je schopný akumulácie PHA. Ku suchej biomase sa pridávala 15% H₂SO₄ v MeOH, aby boli polyméry naštípené a vzniknuté hydroxykyseliny sa previedli na methylestery, ktoré sú prchavé a tým pádom ich je možné analyzovať pomocou plynovej chromatografie. Biomasa bola ešte odobraná na začiatku kultivácie (0 h) a bolo zistené, že baktérie *Cupriavidus necator* H16 veľmi rýchlo akumulovali PHB, pretože obsah PHB v biomase vystúpil z 4,63 % na približne 30 % u každej teploty už po 24 h kultivácie.

Tabuľka 7: Výsledky stanovenia obsahu PHB v biomase pri teplotnom strese

	24 h	45 h	51 h
Teplota	Obsah PHB [%]		
20 °C	34,12	25,42	31,65
30 °C	35,75	25,52	23,28
37 °C	29,62	22,91	25,10



Graf 3: Stanovenie obsahu PHB v biomase pri teplotnom strese

Výsledky experimentu zobrazuje Tabuľka 7 a Graf 3, kde po 24 h kultivácie je u každej teploty obsah PHB v biomase najväčší, keďže baktérie akumulovali PHB pri raste v médiu, kde bol pravdepodobne dostatočný prísun živín. Po 45 hodinách percentuálny obsah PHB v biomase klesol, čo možno vysvetliť tým, že prebiehalo intenzívne množenie baktérií, ktoré obsahujú granule PHB. Avšak tieto granule sa nestíhajú tvoriť rovnakou rýchlosťou s akou sa bunky množia, a tak sa po čase nachádzalo v suspenzii viac buniek bez granúl PHB, než buniek už obsahujúcich intracelulárne granule. Po 51. hodine kultivácie stúpol obsah PHB, pretože sa bunky už nedelili tak rýchlo, a granule sa teda stihli vytvoriť už vo viacerých bunkách s výnimkou pri teplote 30 °C.

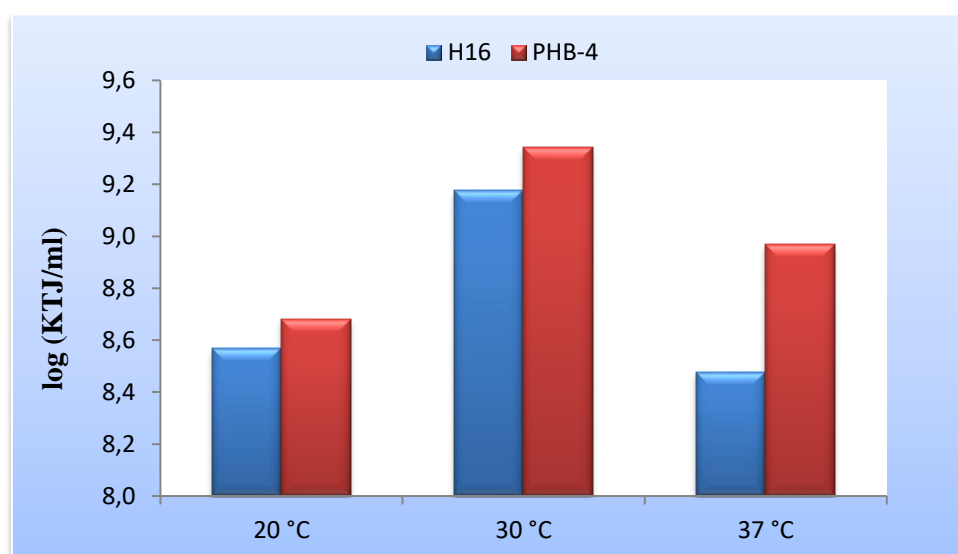
4.1.3 Stanovenie viability monokultúr jednotlivých kmeňov

4.1.3.1 Stanovenie viability výsevom

Množstvo živých buniek v kultúre je možné stanoviť výsevom známych objemov vhodne nariadených suspenzií na agarovej platni. Pri tejto metóde sa predpokladá, že pri inkubácii vyrastie z každej bunky jedna kolónia (KTJ = kolónie tvoriace jednotky). Vzorky na výsev boli odoberané po 26 h inkubácie.

Tabuľka 8: Výsledky výsevu

<i>C.necator</i> H16				
t [°C]	miska 1	miska 2	priemer	KTJ/ml
20	30	43	37	$3,7 \cdot 10^8$
30	103	196	150	$1,5 \cdot 10^9$
37	20	40	30	$3,0 \cdot 10^8$
<i>C.necator</i> H16/PHB-4				
20	41	54	48	$4,8 \cdot 10^8$
30	245	195	220	$2,2 \cdot 10^9$
37	50	135	93	$9,3 \cdot 10^8$

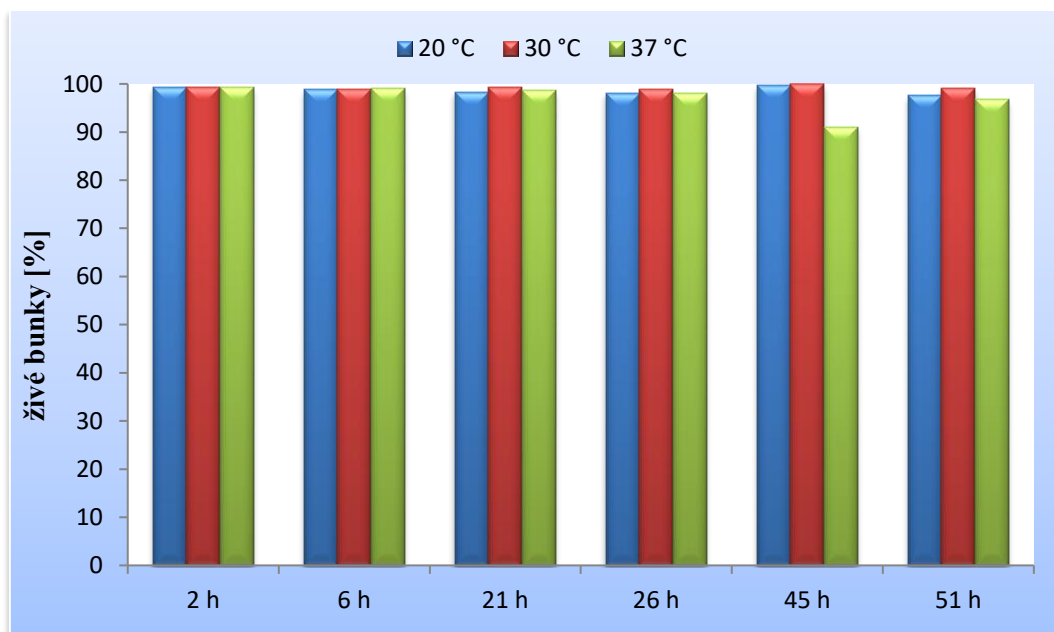


Graf 4: Stanovenie viability výsevom

Uvedené výsledky v Tabuľka 8 a Graf 4 sú pri riedení 10^{-6} , ktoré sa ukázalo ako najvhodnejšie, pričom najväčší počet kolónií bol stanovený u oboch kmeňov jednoznačne pri 30 °C. Dôvodom je, že táto hodnota predstavuje teplotné optimum pre oba kmene. Pre kmeň *C. necator* H16 predstavovala teplota 20 °C lepšie podmienky pre rast buniek než teplota 37 °C. Na rozdiel od kmeňa *C. necator* H16/PHB-4, kde mala teplota 37 °C priaznivejší vplyv na rast kolónií.

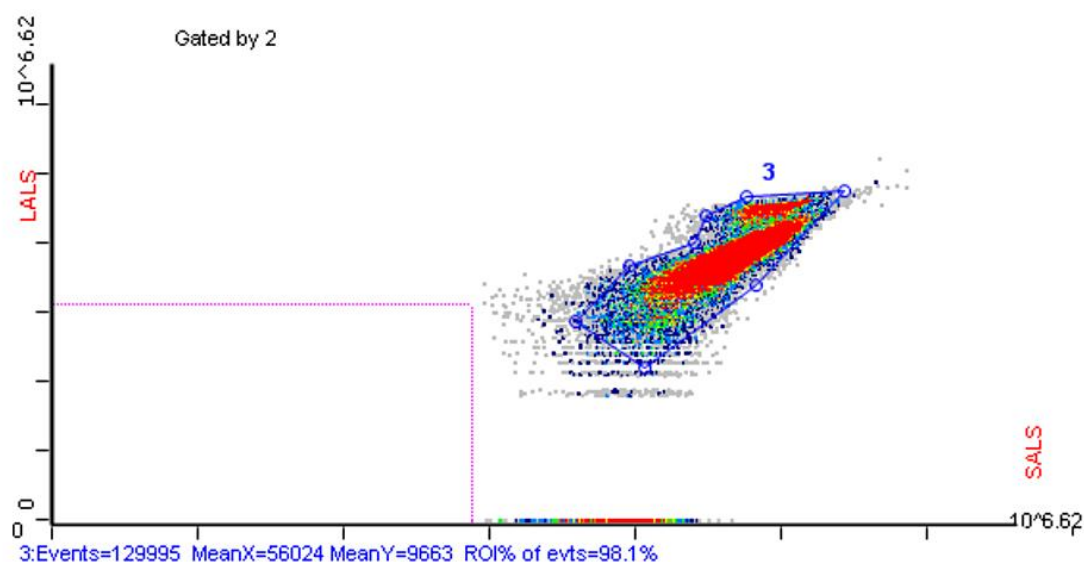
4.1.3.2 Stanovenie viability prietokovou cytometriou

Pri stanovení viability bolo použité ako fluorescenčné farbivo propidium jodid, ktoré sa interkaluje do DNA mŕtvych buniek s porušenými membránami. Viabilita kmeňov *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB-4 bola stanovovaná v časovom úseku tri dni od kultivácie na minerálnom médiu a pri troch rôznych teplotách (20 °C, 30 °C a 37 °C).

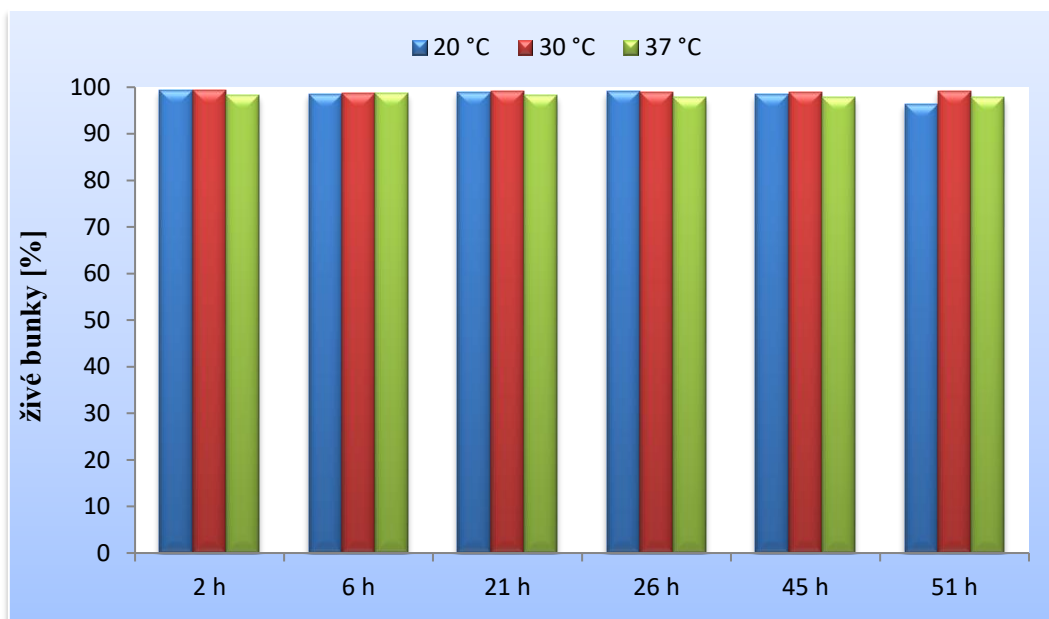


Graf 5: Stanovenie viability *C. necator* H16 pri troch rôznych teplotách

Z Graf 5 vyplýva, že pre bunky *C. necator* H16 nemali experimentálne teploty veľký vplyv na ich životaschopnosť, pričom malé odchýlky nastali po 21. hodine, od ktorej začali mierne prevládať živé bunky pri kultivácii pri 30 °C oproti iným teplotám. Teplota 37 °C sa javila ako menej vhodná pre životaschopnosť buniek než teplota 20 °C, čo sa prejavilo po 45. hodine kultivácie. Rovnaký trend bol zaznamenaný aj pri stanovení viability výsevom v kapitole 4.1.3.1. Pri meraní na prietokovom cytometri bol pozorovaný ďalší trend, kedy u tohto kmeňa vznikli dve oddelené populácie pravdepodobne s rôznym obsahom PHB (Obrázok 13).



Obrázok 13: Cytogram *C. necator* H16 po 2 h kultivácie pri 20 °C



Graf 6: Stanovenie viability *C. necator* H16/PHB⁻⁴ pri troch rôznych teplotách

Pri stanovení počtu živých buniek u kmeňa *C. necator* H16/PHB⁻⁴ nemali experimentálne teploty významný vplyv na odolnosť, ako možno vidieť v Graf 6. Výsledky tiež potvrdili, že teplotné optimum pre kmeň *C. necator* H16/PHB⁻⁴ je 30 °C, kedy bola zaznamenaná najväčšia viabilita, čo súhlasí aj s výsledkami zo stanovenia viability výsevom (kapitola 4.1.3.1).

Z nameraných hodnôt viabilít pre oba kmene možno konštatovať, že teploty 20 °C, 30 °C a 37 °C neznamenali významné zníženie životaschopnosti buniek, a teda odolnosť oboch kmeňov pri týchto teplotách je veľmi podobná.

4.2 Vplyv osmotického stresu

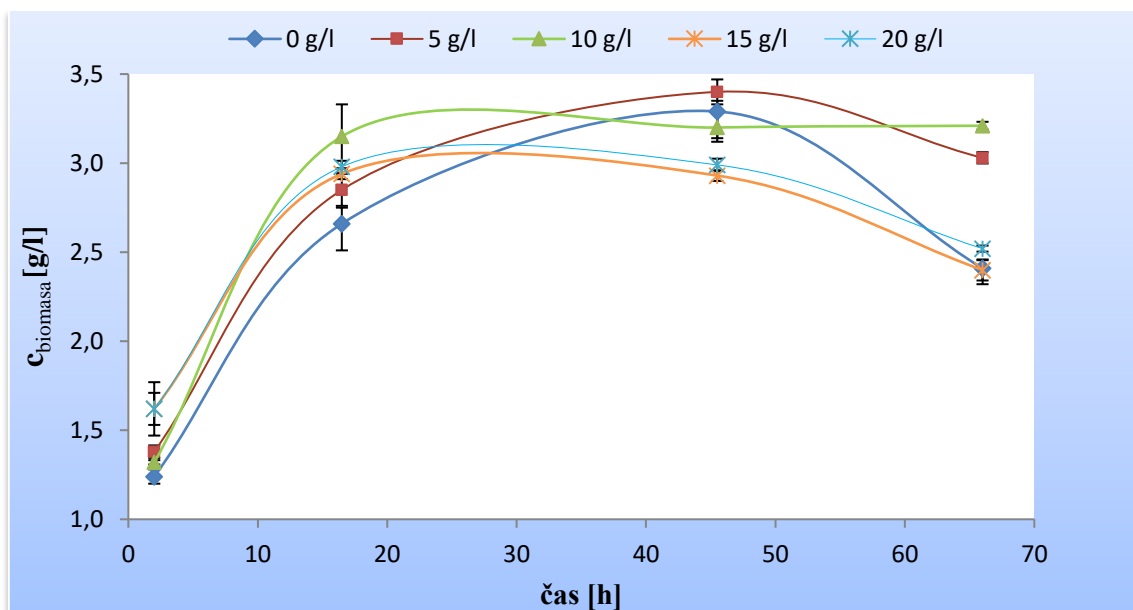
V priebehu experimentu boli suspenzie baktérií kmeňov *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB⁻⁴ inkubované v temperovanej trepačke pri teplote 30 °C a pri 5 rôznych koncentráciach soli NaCl pridanej do živného média, v ktorom prebiehala kultivácia. V rôznych časových úsekoch počas troch dní kultivácie boli odoberané vzorky pre stanovenie biomasy, obsahu PHB v biomase a viability buniek prietokovou cytometriou.

4.2.1 Stanovenie biomasy

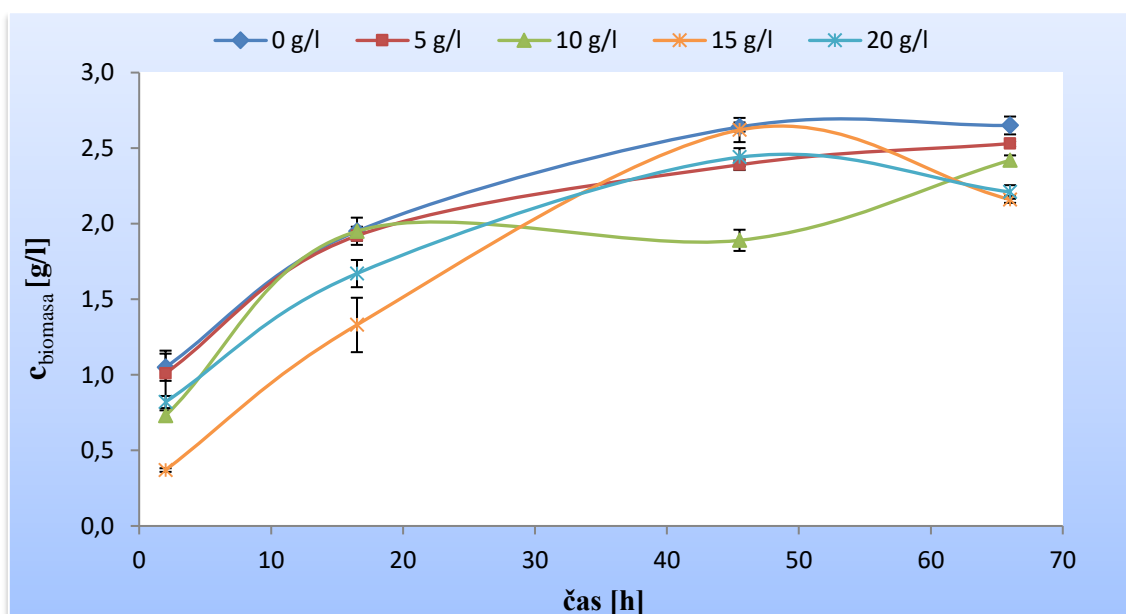
Pre stanovenie celkovej hmotnosti biomasy monokultúr vybraných kmeňov sa využívala metóda gravimetrického stanovenia biomasy a turbidimetrické sledovanie rastu kultúry.

4.2.1.1 Stanovenie biomasy gravimetriou

Pomocou vážkovej analýzy bola v priebehu 68 hodín určená celková hmotnosť biomasy u kmeňov *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB⁻⁴ a následne boli zhotovené rastové krivky pre oba kmene.



Graf 7: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16 pri rôznych koncentráciach NaCl pri gravimetrickom stanovení obsahu biomasy



Graf 8: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16/PHB4 pri rôznych koncentráciach NaCl pri gravimetrickom stanovení obsahu biomasy

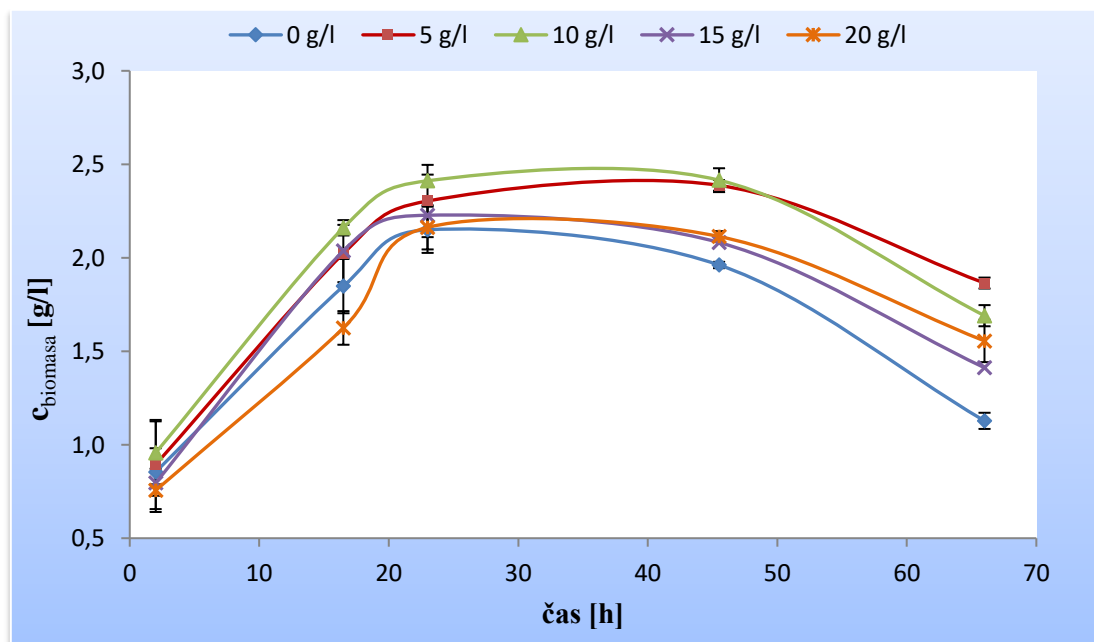
Po zrovnaní grafov vyplýva, že bunky *C. necator* H16 rástli rýchlejšie a dosahovali tak väčšej hmotnosti biomasy, a to pri každej experimentálnej podmienke. Táto skutočnosť bola zistená aj pri teplotnom strese v kapitole 4.1.1. Najväčšie množstvo biomasy u *C. necator* H16 bolo stanovené po 45,5 h pri 5 g/l NaCl (3,29 g/l) a u *C. necator* H16/PHB4 v kontrolnom vzorku pri bez prídavku soli (2,64 g/l) tiež po 45,5 h kultivácie.

4.2.1.2 Stanovenie biomasy spektrofotometrickou metódou

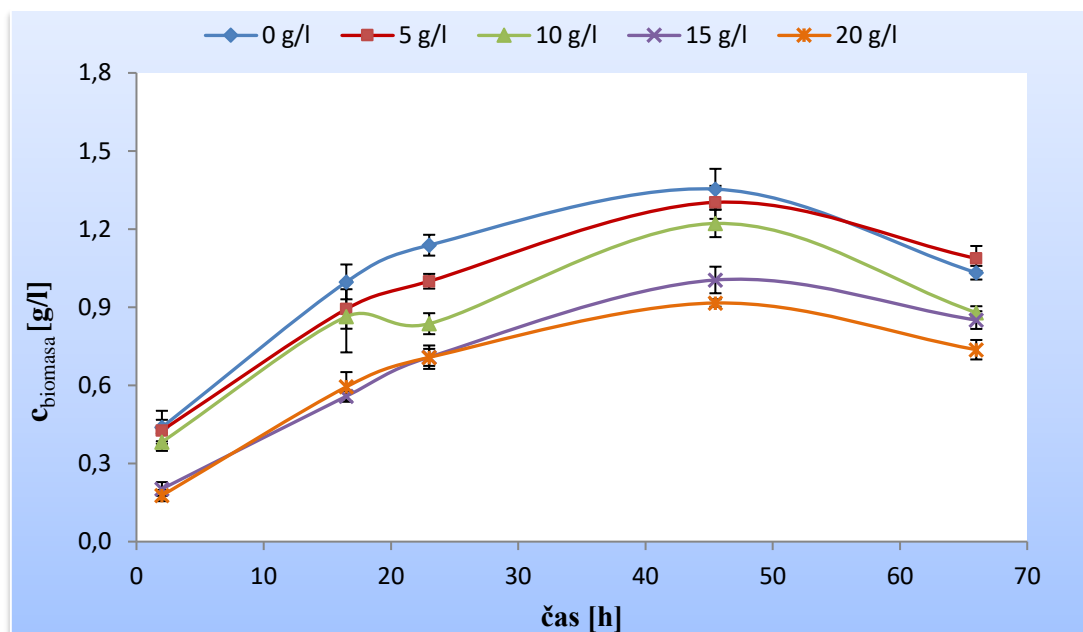
Ďalej bola biomasa stanovovaná pomocou merania zákalu suspenzie buniek pri 630 nm. Vzorky boli odoberané paralelne s gravimetrickým stanovením v priebehu 2 h; 16,5 h; 23 h; 45,5 h a 66 h kultivácie. Rovnako ako u teplotného stresu boli zistené hodnoty rastovej rýchlosti η a zmeny rastovej rýchlosti vyjadrené v %, pričom sa za 100 % považovala rastová rýchlosť pri 0 g/l NaCl.

Tabuľka 9: Porovnanie rastovej rýchlosti a jej zmeny pre jednotlivé kmene pri troch rôznych teplotách

<i>C.necator</i> H16					
parameter	0 g/l	5 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l
η [h^{-1}]	0,0628	0,0689	0,0716	0,0711	0,0658
zmena rastovej rýchlosti [%]	100	110	114	113	97
<i>C. necator</i> H16/PHB-4					
parameter	0 g/l	5 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l
η [h^{-1}]	0,0342	0,0281	0,0332	0,0242	0,0259
zmena rastovej rýchlosti [%]	100	82	97	71	76



Graf 9: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16 pri rôznych koncentráciach NaCl pri spektrofotometrickom stanovení obsahu biomasy



Graf 10: Rastová krivka kmeňa *C. necator* H16/PHB⁻4 pri rôznych koncentráciach NaCl pri spektrofotometrickom stanovení obsahu biomasy

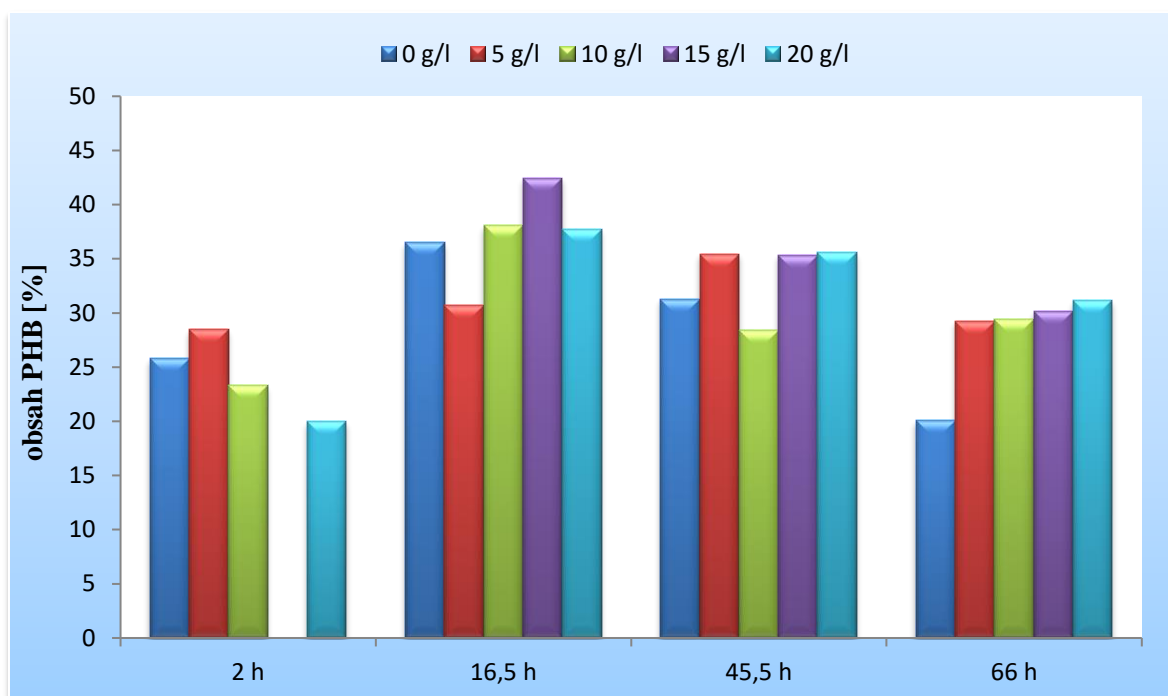
Výsledky potvrdzujú predošlé tvrdenie z gravimetrického stanovenia, kedy boli najväčšie hodnoty biomasy dosiahnuté u kmeňa *C. necator* H16. U mutantného kmeňa *C. necator* H16/PHB⁻4 je v Graf 10 vidno, ako klesala koncentrácia biomasy s rastúcou intenzitou stresu a po 45,5. hodine nastala pri všetkých koncentráciach soli fáza odumierania, čo je možné pozorovať aj u *C. necator* H16 v Grafe 9. Naproti tomu u kmeňa *C. necator* H16 nemali testované koncentrácie výrazné inhibičné účinky, dokonca koncentrácie NaCl 5,10 a 15 g/l do istej miery podporovali rast biomasy. Menej výrazný inhibičný účinok je patrný až u koncentrácie NaCl 20 g/l, kde podľa Tabuľky 9 zmena rastovej rýchlosti klesla na 97 %. Celkovo možno konštatovať, že schopnosť akumulácie PHB u *C. necator* H16 mala do istej miery protektívny účinok voči miernemu osmotickému šoku.

4.2.2 Stanovenie obsahu PHB v biomase

Vzorky *C. necator* H16 pre stanovenie obsahu PHB v biomase boli odoberané po 2 h; 16,5 h; 45,5 h a 66 h kultivácie v NB médiu s rôznou koncentráciou soli NaCl. Obsah PHB nebol stanovený pri koncentrácii NaCl 15 g/l po 2 h z dôvodu chybného nástreku vzorky pri meraní na plynovom chromatografii.

Tabuľka 10: Výsledky stanovenia obsahu PHB pri osmotickom strese

	2 h	16,5 h	45,5 h	66 h
Koncentrácia NaCl	Obsah PHB [%]			
0 g/l	25,78	36,49	31,28	20,09
5 g/l	28,47	30,72	35,45	29,26
10 g/l	23,31	38,06	28,41	29,37
15 g/l	–	42,45	35,36	30,15
20 g/l	20,00	37,75	35,56	31,11



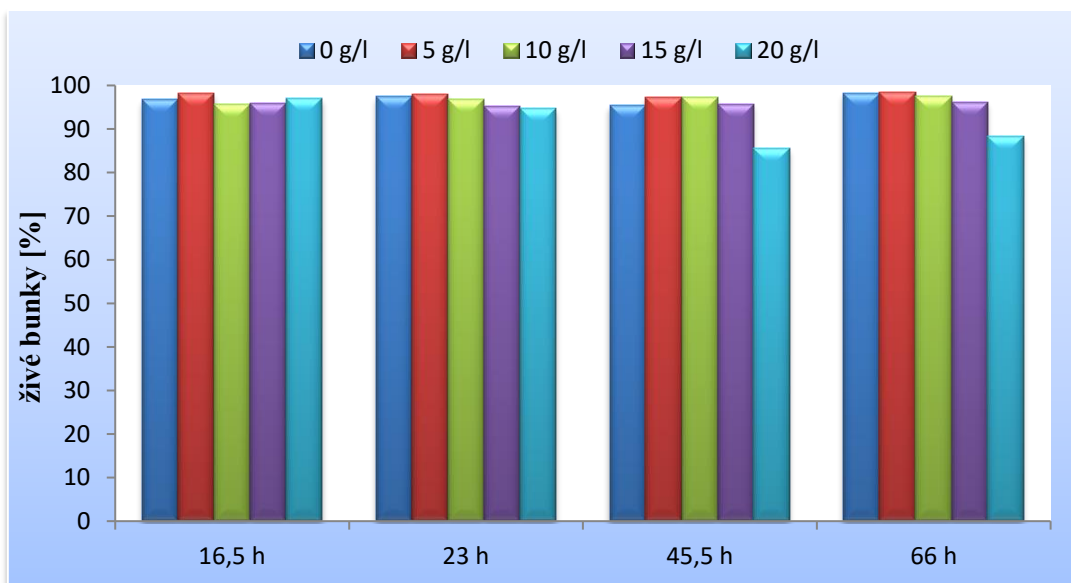
Graf 11: Stanovenie obsahu PHB v biomase pri rôznych koncentráciach NaCl

Po 2 hodinách kultivácie začal obsah PHB v sušine biomasy stúpať až do 16,5 h pri všetkých koncentráciach soli NaCl, kedy sa v médiu nachádzalo dostatok fruktózy ako primárneho zdroju uhlíka a energie. Pri koncentrácii NaCl 20 g/l nedošlo k výraznejšej využitiu PHB, čo vysvetľuje následnú zníženú viabilitu buniek pri meraní na cytometri (Graf 12). Rovnako tomu bolo u koncentrácie NaCl 15 g/l, kde však po 16,5. hodine nastal mierny pokles PHB, čiže bunky o niečo lepšie odolávali tejto stresovej podmienke. Baktérie v kontrolnom vzorku a pri 10 g/l začali metabolizovať PHB už po 16.5 hodine, takže bunky sa mohli naďalej deliť.

Po celkovom zrovnaní výsledkov sa zdá, že rýchlosť akumulácie je v prítomnosti soli zrovnateľná s kontrolným vzorkom, avšak rýchlosť využitia je už nižšia. Môže to znamenať, že bunky si akoby chceli za vyššieho osmotického stresu ponechať trochu vyšší obsah PHB, čo potvrdzuje jeho protektívnu úlohu.

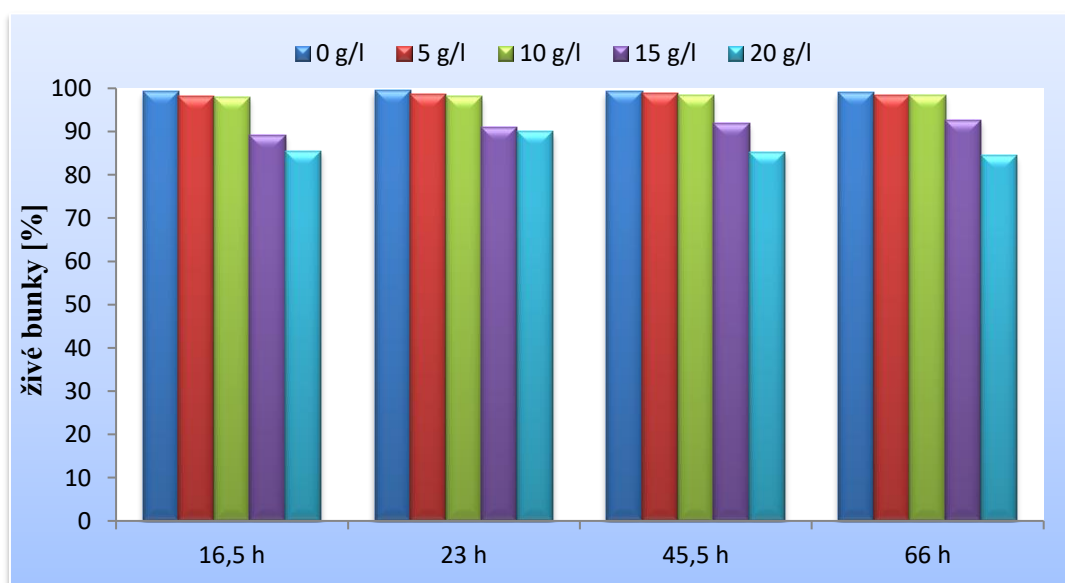
4.2.3 Stanovenie viability prietokovou cytometriou

V tejto analýze bolo použité fluorescenčné farbivo propidium jodid, ktoré bunky s nepoškodenými membránami vylúčia a do mŕtvych buniek sa interkaluje do DNA, vďaka narušeným membránam. U vybraných kmeňov *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB⁻⁴ bola stanovovaná viabilita v časovom úseku tri dni pri 30 °C od kultivácie na minerálnom médiu a pri rozličných koncentráciach NaCl: 0 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l a 20 g/l.

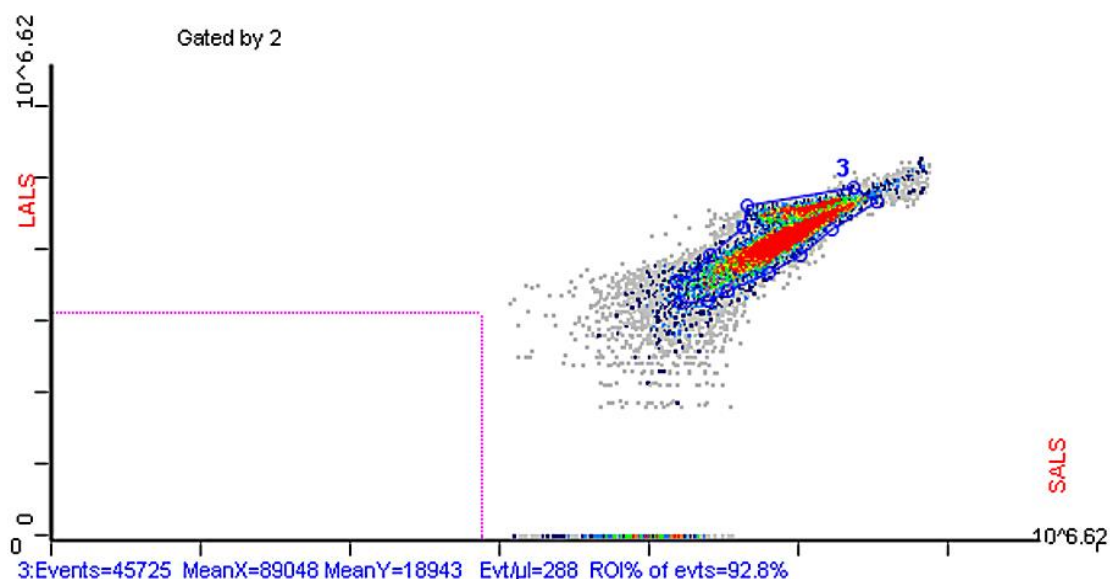


Graf 12: Stanovenie viability kmeňa *C. necator* H16 pri rozličných koncentráciach NaCl

Stresové podmienky spôsobili nerovnováhu metabolizmu, ktorá viedla k pomerne vysokej produkcii PHB. Problém ale nastal vo chvíli, kedy sa z média vyčerpala fruktóza ako primárny zdroj uhlíku a energie. V tomto okamihu kontrolný vzorok s 0 g/l NaCl a vzorky s 10 a 15 g/l NaCl zmenili svoju metabolickú stratégiu a začali utilizovať naakumulované PHB, zatiaľ čo baktérie pod vplyvom ostatných experimentálnych podmienok to nedokázali – nedošlo k poklesu PHB a bunky začali po čase umierať, ako možno pozorovať v Graf 12. Vzhľadom k tomu, že *C. necator* H16/PHB-4 nedokáže akumulovať PHB, pokles viability nastal ihneď už po 16,5 h a odpovedal intenzite stresového faktoru (Graf 13), kedy bolo percento živých buniek pri 20 g/l najmenšie. Po 45,5. hodine bol tiež na cytogramoch (Obrázok 14) pozorovaný trend, kedy sa u kmeňa *C. necator* H16 začali tvoriť dve populácie s rôznym obsahom PHB, ako tomu bolo aj pri teplotnom strese.



Graf 13: Stanovenie viability kmeňa *C. necator* H16/PHB-4 pri rozličných koncentráciach NaCl



Obrázok 14: Cytogram *C. necator* H16 pri koncentrácii NaCl 10 g/l po 45,5 h

4.3 Kokultivácia oboch kmeňov *Cupriavidus necator*

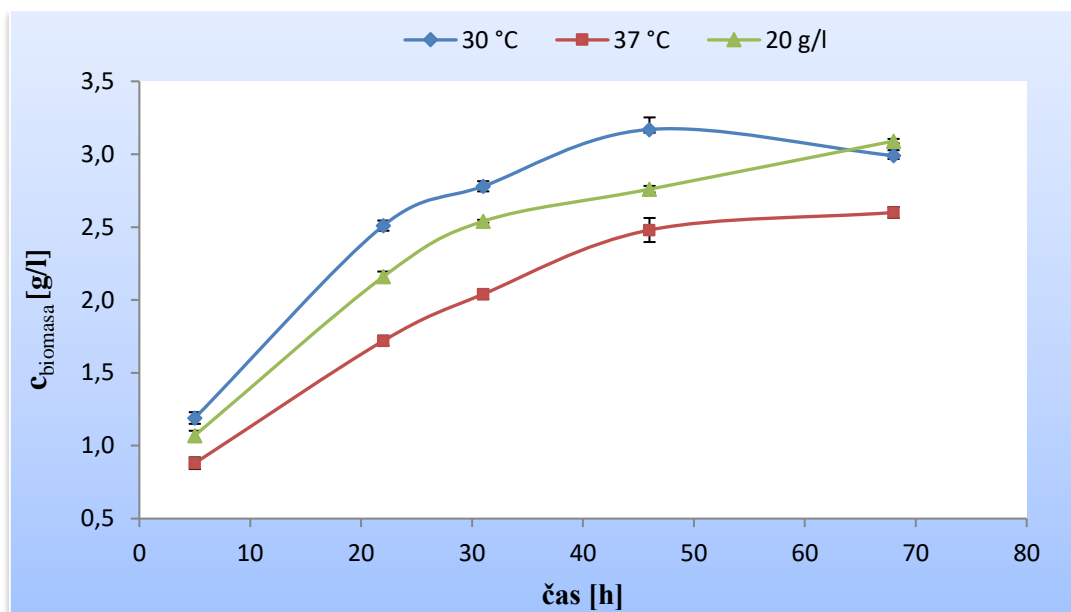
V tejto časti experimentálnej práce boli dva doposiaľ používané kmene kokultivované (v médiu, ktoré obsahovalo 5 % inokula každého kmeňa), pričom inokulá kmeňov boli preočkované do minerálneho produkčného média a kultivované tri dni. Potom boli z tohto inokula odobrané vzorky osobitne pre každý kmeň a následne sa do pripraveného média NB preočkovalo 5 % inokula každého kmeňa a prebehla kultivácia pri rôznych podmienkach teploty a koncentrácie soli NaCl. Prvou testovanou podmienkou bolo použitie koncentrácie NaCl 20 g/l (inkubované pri 30 °C), druhou bola teplota 30 °C (koncentrácia NaCl 0 g/l) a poslednou teplota 37 °C (koncentrácia NaCl 0 g/l). Vzorky sa odoberali v priebehu troch dní kultivácie v rôznych časových úsekoch pre stanovenie biomasy, obsahu PHB v biomase a zastúpenia jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre.

4.3.1 Stanovenie biomasy

Pre vyjadrenie celkovej hmotnosti biomasy zmiešanej kultúry kokultivovaných kmeňov pri rozličných podmienkach uvedených vyššie sa využívalo turbidimetrické sledovanie rastu kultúry a paralelne boli odoberané vzorky pre gravimetrické stanovenie biomasy.

4.3.1.1 Stanovenie biomasy gravimetriou

V priebehu časového rozpätia od 5 h do 68 h kultivácie v médiu bolo odoberaných vždy 10 ml bakteriálnej suspenzie, z ktorej sa vyhodnocoval obsah sušiny v g/l.



Graf 14: Rastová krivka zmiešanej kultúry pri gravimetrickom stanovení obsahu biomasy

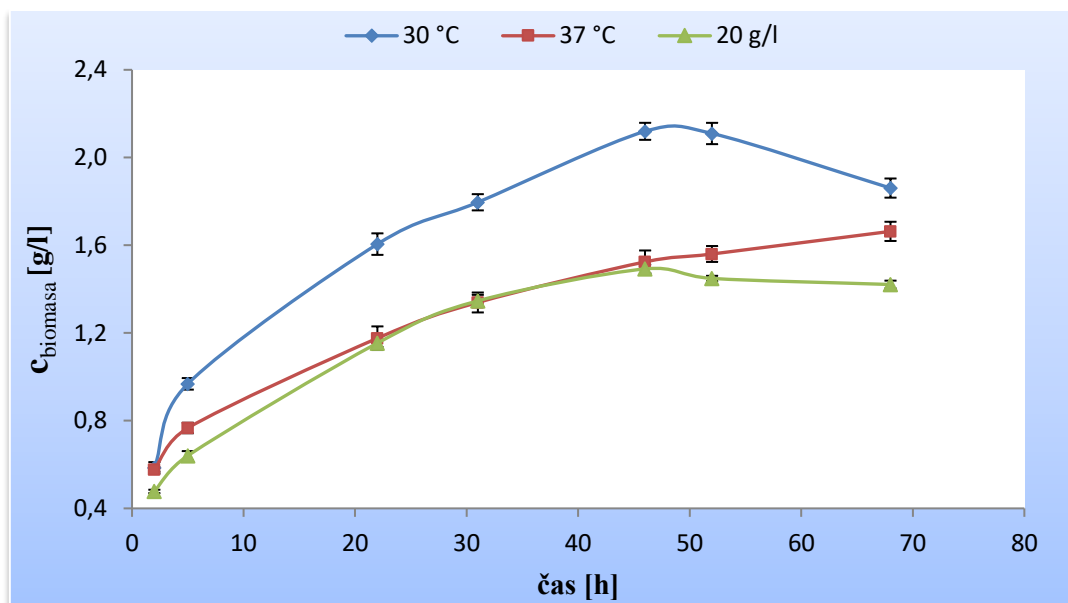
Pri porovnaní rastových kriviek pri všetkých podmienkach kultúry vykazujú krivky veľmi podobnú dynamiku rastu biomasy so stúpajúcim časom. U všetkých troch kriviek dochádza po 22. hodine k neustále sa zvyšujúcemu rastu biomasy, s výnimkou v čase 68 h u kultivácie pri 30 °C, kde biomasa klesla z 3,17 g/l na 2,99 g/l. To možno interpretovať tak, že nastala fáza odumierania. Ďalej sa dá pri všetkých podmienkach pozorovať, že v čase od 5. hodiny do 22. hodiny prebiehal najväčší nárast biomasy (exponenciálny rast), pri ktorej postupne rýchlosť rastu začala klesať. Z grafu tiež vyplýva, že najväčšie množstvo biomasy (maximum 3,17 g/l) bolo zaznamenané pri kultivácii pri 30 °C, čo je logické, pretože je to teplotné optimum pre oba koky kultivované kmene.

4.3.1.2 Stanovenie biomasy spektrofotometrickou metódou

Vzorky pre turbidimetrické stanovenie obsahu biomasy boli odoberané paralelne so vzorkami pre gravimetrické stanovenie a toto meranie bolo brané skôr ako doplnkové ku gravimetrickému stanoveniu, ktoré má presnejšiu výpovednú hodnotu. Znova boli zistené hodnoty rastovej rýchlosti η a zmeny rastovej rýchlosti vyjadrené v %, pričom sa za 100 % považovala rastová rýchlosť pri 30 °C (0 g/l NaCl).

Tabuľka 11: Porovnané hodnoty rastovej rýchlosti a jej zmeny pri rôznych podmienkach u zmiešanej kultúry

parameter	30 °C	37 °C	20 g/l NaCl
η [h^{-1}]	0,0395	0,0252	0,0296
zmena rastovej rýchlosti [%]	100	64	75

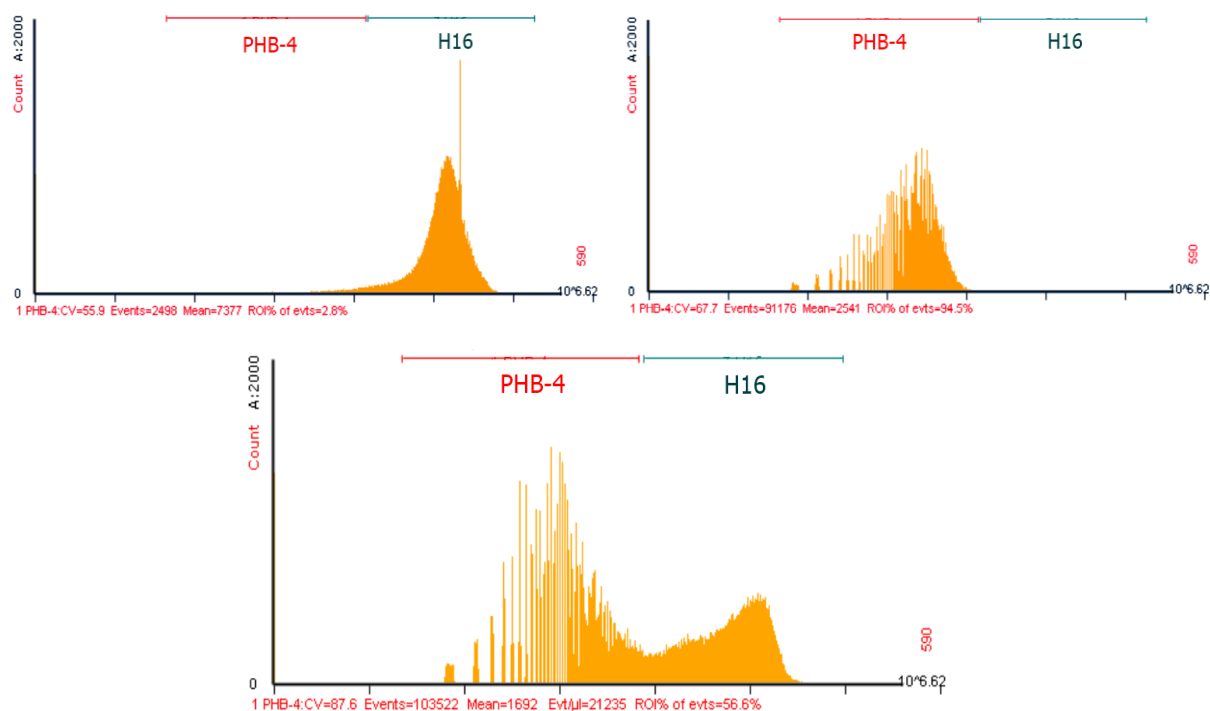


Graf 15: Rastová krivka zmiešanej kultúry pri spektrofotometrickom stanovení obsahu biomasy

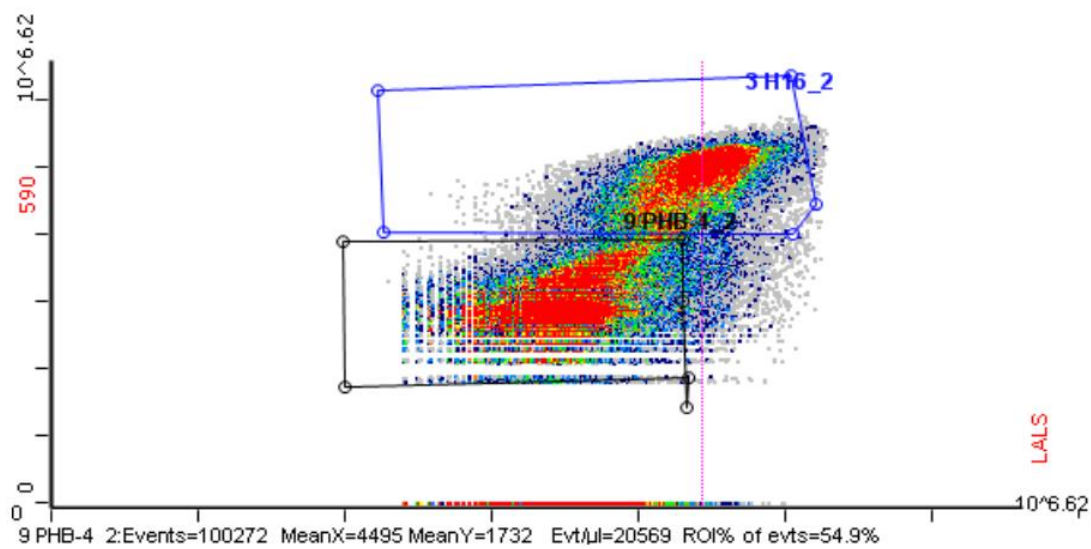
Krivky z grafu majú veľmi podobný priebeh ako rastové krivky z gravimetrického stanovenia, okrem podmienky pri koncentrácii NaCl 20 g/l, kedy po 46. hodine začal obsah biomasy klesať, čo ale mohlo byť spôsobené menšou presnosťou tejto metódy. Taktiež rovnako ako u gravimetrického stanovenia sa dá pozorovať, že pri 30 °C po 52. hodine nastala fáza odumierania spôsobená pravdepodobne nedostatkom živín v médiu a pri tejto teplote zmiešaná kultúra dosahovala najväčšieho množstva biomasy. Rozdiel oproti gravimetrii nastal ešte pri 37 °C a 20 g/l, kde obsah biomasy pri 37 °C prevýšil obsah pri 20 g/l. Hodnoty obsahu biomasy sa značne líšili medzi oboma stanoveniami, avšak pre náš experiment bol dôležitejší priebeh a dynamiku rastu, čo bolo u oboch stanovení približne rovnaké.

4.3.2 Stanovenie percentuálneho zastúpenia jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre

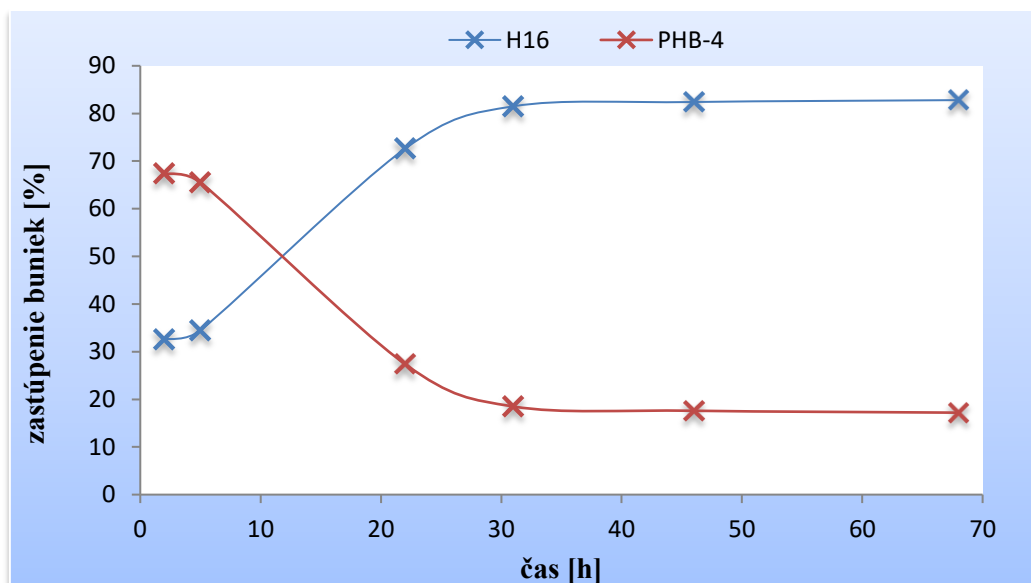
V priebehu kultivácie bolo pomocou prietokovej cytometrie stanovované percentuálne zastúpenie jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre obsahujúcej 5 % každého kmeňa. Pri tomto meraní bola ako fluorescenčné farbivo využívaná Nilská červeň (farbiaca fosfolipidy) po permeabilizácii buniek vychladeným 20 % ethanolom ako bolo popísané v kapitole 3.6.2. Taktiež bolo potrebné odobrať vzorky samostatných kultúr kmeňov pred kokultiváciou na priradenie miesta signálu každého kmeňa v zmiešanej kultúre (Obrázok 15). Kmeň *C. necator* H16/PHB⁻4 vykazoval počas merania menšiu intenzitu fluorescencie, než *C. necator* H16 vďaka neprítomnosti PHB granúl (Obrázok 15).



Obrázok 15: Histogram kmeňa *C. necator* H16 (naľavo), *C. necator* H16/PHB-4 (vpravo), zmiešanej kultúry pri koncentrácii NaCl 20 g/l po 22 h (dole)

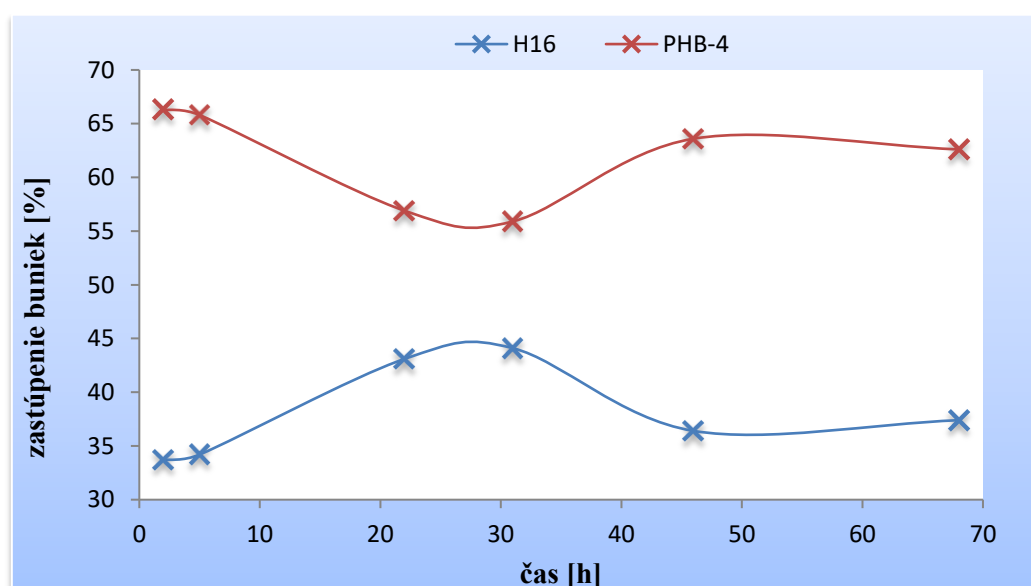


Obrázok 16: Cytogram zmiešanej kultúry



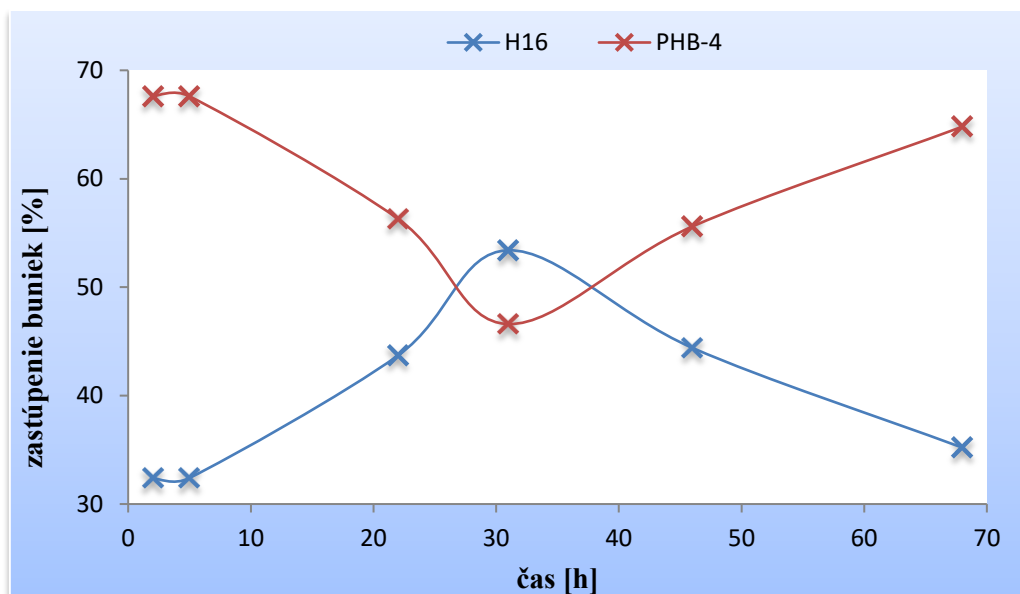
Graf 16: Zastúpenie jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre pri 30 °C

Z Graf 16 možno usúdiť, že pri normálnych podmienkach (30 °C, 0 g/l NaCl) bunky *C. necator* H16 už po 22. hodine rástli omnoho rýchlejšie než bunky mutantného kmeňa, a to pravdepodobne vďaka využitiu naprodukovanej PHB.



Graf 17: Zastúpenie jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre pri 37 °C

Za zvýšenej teploty dokázali bunky *C. necator* H16 navýšiť svoj pomer oproti počiatočnému stavu, avšak nedominovali tak výrazne ako za optimálnych podmienok.



Graf 18: Zastúpenie jednotlivých kmeňov v zmiešanej kultúre pri koncentrácii NaCl 20 g/l

Podobne ako pri zvýšenej teplote to bolo aj pri navýšení osmotickej sily - bunky *C. necator* H16 navýšili svoj podiel v zmiešanej kultúre z 30 % na 53 % (v 31 h), avšak efekt nebol tak patrný ako za optimálnych podmienok.

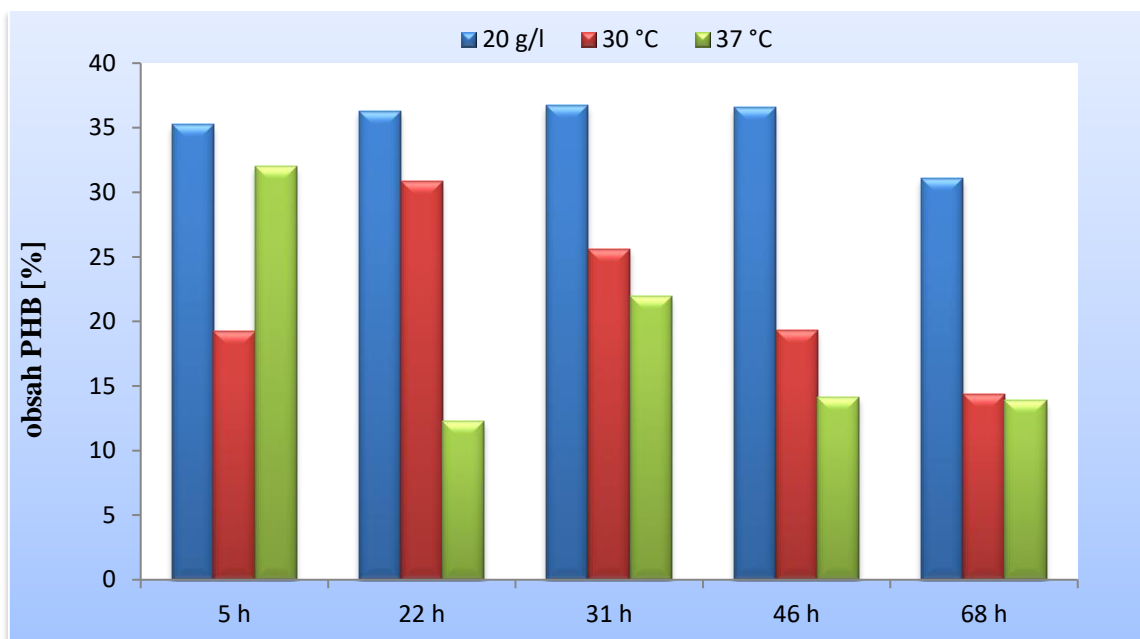
Pri všetkých podmienkach je tiež možné pozorovať, že až do 5. hodiny sa percentuálne zloženie nemenilo, u baktérií prebiehala pravdepodobne lag-fáza.

4.3.3 Stanovenie obsahu PHB v biomase

Obsah polyhydroxyalkanoátov v biomase zmiešanej kultúry bol stanovovaný pri kultivácii v médiu obsahujúcom 20 g/l NaCl (inkubované pri 30 °C), ďalej v médiách bez NaCl inkubovaných pri 30 °C a 37 °C. Vzorky sa odoberali po 5 h, 22 h, 31 h, 46 h, 68 h od začiatku kultivácie v stanovených podmienkach a boli analyzované pomocou plynovej chromatografie s FID detektorom.

Tabuľka 12: Výsledky stanovenia obsahu PHB v biomase pri kokultivácii

	5 h	22 h	31 h	46 h	68 h
Podmienka	Obsah PHB [%]				
20 g/l NaCl	35,27	36,29	36,70	36,54	31,08
30 °C	19,26	30,85	25,61	19,31	14,38
37 °C	31,99	12,27	21,98	14,12	13,88



Graf 19: Stanovenie obsahu PHB v biomase pri rôznych podmienkach kokultivácie

Teplota 30 °C – v Graf 19 je vidieť, že obsah PHB stúpol od začiatku až do 22. hodiny, pretože bunky mali dostatok externého zdroja uhlíka a tak *C. necator* H16 akumuloval PHB, ktorého množstvo začalo následne klesať práve po tejto hodine (22 h), kedy už *C. necator* H16 v kultúre postupne utilizovala PHB kvôli úbytku externého zdroja uhlíka.

Teplota 37 °C – vzhľadom na výsledky z prietokovej cytometrie (Graf 17), pri tejto teplote mierne prevládal mutantný kmeň *C. necator* H16/PHB⁻⁴ v zmiešanej kultúre. Nečakane bolo teda naakumulované množstvo na počiatku kultivácie (po 5 h) väčšie než pri teplote 30 °C. Avšak už po 22 hodinách bolo množstvo PHB menšie až do konca kultivácie a predošlý výsledok po 5 h sa môže považovať za menej relevantný, a tak možno výsledky pri tejto teplote zhodnotiť rovnako ako už bolo zmienené u teploty 30 °C vyššie.

Koncentrácia NaCl 20 g/l – z Graf 19 možno vyčítať, že pri tejto podmienke bol najväčší obsah PHB, čo by mohlo potvrdzovať predošlú teóriu u osmotického stresu, že *C. necator* H16 spomalila svoj rast ako odozvu na tento stres, ale bunky neumierali, čiže nemuseli utilizovať PHB, ktorého množstvo bolo stále približne rovnaké.

5 ZÁVER

V predloženej bakalárskej práci bola v rámci experimentálnej časti skúmaná stresová odolnosť vybraných bakteriálnych monokultúr a definovanej zmiešanej kultúry voči teplotnému a osmotickému stresu. Ako modelový organizmus pre produkciu PHA bol použitý kmeň *Cupriavidus necator* H16 a mutantný kmeň *Cupriavidus necator* H16/PHB⁻⁴ neschopný akumulácie PHA. Definovaná zmiešaná kultúra bola pripravená kokultiváciou týchto dvoch kmeňov v rovnakom pomerovom množstve.

Prvým experimentom bolo skúmanie vplyvu troch rôznych teplôt - 20 °C, 30 °C a 37 °C - v priebehu 72 hodín počas kultivácie v NB médiu na vybrané bakteriálne kmene *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB⁻⁴.

- Ako najvhodnejšia teplota pre produkciu biomasy sa ukázala teplota 37 °C pre oba kmene, aj napriek obecnému uvádzanému teplotnému optimu 30 °C a ako najmenej vhodná teplota 20 °C. Ďalšou pozorovanou skutočnosťou pri stanovení biomasy bolo, že pri všetkých teplotách vyšlo množstvo biomasy vždy najväčšie u kmeňa *C. necator* H16.
- Pri stanovovaní PHB v biomase bolo zistené, že baktérie *C. necator* H16 veľmi rýchlo akumulovali PHB, pretože jeho obsah v biomase vystúpil z 4,63 % na približne 30 % u každej teploty už po 24 h kultivácie. Percentuálny obsah následne mierne klesol, keďže prebiehalo intenzívne množenie baktérií a granule PHB sa v baktériách nestíhali tvoriť rovnakou rýchlosťou. Avšak po 51. hodine kultivácie už znova stúpol obsah PHB, pretože sa bunky už nedelili tak rýchlo, a granule sa teda stihli vytvoriť už vo viacerých bunkách.
- Z nameraných hodnôt viabilít pomocou prietokovej cytometrie pre oba kmene možno konštatovať, že experimentálne teploty neznamenali významné zníženie životaschopnosti buniek, a teda odolnosť oboch kmeňov pri týchto teplotách bola veľmi podobná. Z výsledkov tiež vyplýva, že teplotné optimum pre oba kmene predstavuje teplota 30 °C. Pri stanovení viability výsevom po 26 h kultivácie bol počet kolónií u oboch kmeňov najvyšší pri teplote 30 °C, ktorá predstavuje teplotné optimum pre oba kmene, čo potvrdilo aj predchádzajúce tvrdenie.

Druhým posudzovaným faktorom bol vplyv NaCl v rôznych koncentráciách – 0, 5, 10, 15 a 20 g/liter živného média NB na bakteriálne kmene *C. necator* H16 a *C. necator* H16/PHB⁻⁴. Monokultúry vybraných kmeňov boli počas kultivácie inkubované pri 30 °C.

- Množstvo biomasy bolo stanovované gravimetriou a paralelne spektrofotometricky. Po zrovnaní výsledkov oboch stanovení možno konštatovať, že bunky *C. necator* H16 dosahovali väčšej hmotnosti biomasy pri každej experimentálnej podmienke. U mutantného kmeňa bol pozorovaný inhibičný účinok zvyšujúci sa s rastúcou osmotickou silou, na rozdiel od kmeňa *C. necator* H16, ktorého schopnosť akumulácie PHB mala do istej miery protektívny účinok voči osmotickému šoku.
- Stresové podmienky spôsobili nerovnováhu metabolizmu, ktorá viedla k pomerne vysokej produkcii PHB. Rýchlosť akumulácie PHB bola v prítomnosti soli zrovnateľná s kontrolným vzorkom bez soli, avšak rýchlosť využitia už bola nižšia. To mohlo znamenať, že bunky si akoby chceli za vyššieho osmotického stresu ponechať trochu vyšší obsah PHB, čo potvrdzuje jeho protektívnu úlohu.

- Po vyčerpaní fruktózy ako primárneho zdroja uhlíka a energie vzorky s 10 a 15 g/l NaCl a kontrolný vzorok zmenili svoju metabolickú stratégiu a začali utilizovať naakumulované PHB, zatiaľ čo baktérie pod vplyvom ostatných koncentrácií soli to nedokázali, nedošlo k poklesu PHB a bunky tak začali po čase umierať. U kmeňa *C. necator* H16/PHB⁻4 nastal pokles viability ihneď, keďže nedokáže akumulovať PHB, a odpovedal intenzite stresového faktoru.

V poslednej časti experimentálnej práce boli oba doposiaľ používané kmene kokultivované, pričom prvou testovanou podmienkou bolo použitie koncentrácie NaCl 20 g/l (inkubované pri 30 °C), ďalšími boli kultivácie v médiu bez NaCl a inkubované pri 30 °C a 37 °C.

- Dynamika rastu bakteriálnej biomasy bola veľmi podobná u stanovenia biomasy gravimetriou aj spektrofotometriou a tiež bolo možné pozorovať, že pri teplote 30 °C po 52 hodinách kultivácie nastala fáza odumierania spôsobená pravdepodobne nedostatkom živín v médiu. Pri tejto teplote tiež zmiešaná kultúra dosahovala najväčšieho množstva biomasy, keďže predstavuje teplotné optimum pre oba kmene.
- Ďalej bolo zistené, že pri normálnych podmienkach (30 °C, 0 g/l NaCl) bunky *C. necator* H16 rástli omnoho rýchlejšie než bunky mutantného kmeňa pravdepodobne vďaka utilizácii naprodukovanej PHB. Pri zvyšných dvoch podmienkach bunky *C. necator* H16 navýšili svoj pomer oproti počiatočnému stavu, avšak nedominovali ako za optimálnych podmienok.
- Pri stanovení obsahu PHB v zmiešanej kultúre pri teplote 30 °C (0 g/l NaCl) obsah PHB začal klesať po 22. hodine, kedy pravdepodobne *C. necator* H16 v kultúre postupne utilizovala PHB kvôli úbytku externého zdroja uhlíka a energie. Pri teplote 37 °C (0 g/l NaCl) podľa stanovenia prietokovou cytometriou prevládal kmeň *C. necator* H16/PHB⁻4 v zmiešanej kultúre, a tak už po 22 h kultivácie bolo množstvo PHB menšie než pri 30 °C. Pri podmienke 20 g/l NaCl (30 °C) bol najväčší obsah PHB v biomase, čo mohlo byť spôsobené tým, že *C. necator* H16 spomalila svoj rast ako odozvu na tento stres, ale bunky neumierali, čiže nemuseli utilizovať PHB, ktorého množstvo bolo stále približne rovnaké.

Celkovo možno konštatovať, že akumulácia a následná utilizácia zvýšila odolnosť baktérií, čo sa najviac ukázalo v prípade osmotického stresu, kedy koncentrácie soli nespôsobili výraznejšie zníženie viability oproti mutantnému kmeňu, ktorého viabilita klesala s rastúcou intenzitou stresu. Avšak je veľmi pravdepodobné, že vplyv na stresovú odolnosť PHA akumulujúcich a neakumulujúcich buniek majú tiež ďalšie aspekty, ktoré je potreba ďalej skúmať, keďže stresová odpoveď je kombináciou rôznych stratégií na prežitie.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ŠIMONOVÍČOVÁ, Alexandra. *Environmentálna mikrobiológia. I.* Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2013.
- [2] FULDA, Simone, Adrienne GORMAN, Osamu HORI a Afshin SAMALI. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2010, **2010**(1), 1-23 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1155/2010/214074. ISSN 16878876. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/214074/>
- [3] FRANKHAM, R. Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology* [online]. 2005, **18**(4), 750-755 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x. ISSN 1010061x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x>
- [4] GALPERIN, Michael, Anastasia NIKOLSKAYA a Eugene KOONIN. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2001, **203**(1), 11-21 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10814.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10814.x>
- [5] Effects of temperature on cell membranes. *Symposia of the Society for Experimental Biology* [online]. 1988, (1), 237-258 [cit. 2016-05-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/20078144_Effects_of_temperature_on_cell_membranes
- [6] KAZMIERCZAK, M., M. WIEDMANN a K. BOOR. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2005, **69**(4), 527-543 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005. ISSN 10922172. Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005>
- [7] The Regulatory Role of Ferric Uptake Regulator (Fur) during Anaerobic Respiration of *Shewanella piezotolerans* WP3. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(10), 1-12 [cit. 2016-05-09]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075588>
- [8] SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* [online]. 1997, **82**(2), 291-295 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024. ISSN 09580670. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- [9] Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* [online]. 2000, **3**(1), 3-8 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/9235>
- [10] MARTINDALE, Jennifer a Nikki HOLBROOK. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival*. *Journal of Cellular Physiology*. Wiley Online Library, 2002, **192**(1), 1-15. DOI: 10.1002/jcp.10119. ISSN 10974652. Dostupné také z: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10119>
- [11] STORZ, Gisela. a Regine. HENGGE. *Bacterial stress responses*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2011. ISBN 1555816215.

- [12] Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* [online]. 1989, **53**(1), 121-147 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/53/1/121.full.pdf+html>
- [13] BURG, M. a J. FERRARIS. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(12), 7309-7313 [cit. 2016-05-22]. DOI: 10.1074/jbc.R700042200. ISSN 00219258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R700042200>
- [14] Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* [online]. American Society for Microbiology, 1999, **63**(1), 230-262 [cit. 2016-05-22]. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/63/1/230.full.pdf+html>
- [15] Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant Physiol.* [online]. 1998, **117**(1), 1135–1141 [cit. 2016-05-22]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/117/4/1135.short>
- [16] YURA, Takashi a Kenji NAKAHIGASHI. Regulation of the heat-shock response. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1999, **2**(2), 153-158 [cit. 2016-05-23]. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80027-7. ISSN 13695274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800277>
- [17] BEARSON, Shawn, Bradley BEARSON a John FOSTER. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Wiley Online Library, 1997, **147**(2), 173-180 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10238.x. ISSN 15746968. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10238.x>
- [18] RIAL, Diego, José VÁZQUEZ a Miguel MURADO. Effects of three heavy metals on the bacteria growth kinetics: a bivariate model for toxicological assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **90**(3), 1095-1109 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1007/s00253-011-3138-1. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3138-1>
- [19] HOBMAN, Jon a Lisa CROSSMAN. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2015, **64**(5), 471-497 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1099/jmm.0.023036-0. ISSN 00222615. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.023036-0>
- [20] TREVORS, J.T., K.M. ODDIE a B.H. BELLIVEAU. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1985, **32**(1), 39-54 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb01181.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01181.x>
- [21] Bacterial Growth Curve. In: *Vlab.amrita.edu* [online]. 2011 [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>
- [22] Bacterial Growth Curve. In: *Online.science.psu.edu* [online]. The Pennsylvania State University, 2017 [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: https://online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6122
- [23] PERIASAMY, Saravanan, Harikrishnan NAIR, Kai LEE, Jolene ONG, Jie GOH, Staffan KJELLEBERG a Scott RICE. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exopolysaccharides are

- important for mixed species biofilm community development and stress tolerance. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, **6**, - [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00851. ISSN 1664302x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00851/abstract>
- [24] Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of Tailor-made Bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology* [online]. 2007, **9**(1), 41-62 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <http://www.caister.com/cimb/v/v9/41.pdf>
- [25] Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1996, **49**(1), 1-14 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1%3C1::AID-BIT1%3E3.0.CO;2-P/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1%3C1::AID-BIT1%3E3.0.CO;2-P/epdf)
- [26] RICHTER, Felix. *Biotechnology: Research, technology and applications*. New York: Nova Science Publishers, 2008. ISBN 978-1-60456-901-8.
- [27] Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 1999, **63**(1), 21-53 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98956/pdf/mr000021.pdf>
- [28] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2007, **102**(6), 1437-1449 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- [29] GRAGE, Katrin, Anika JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANISAMY, Indira RASIAH, Jane ATWOOD a Bernd REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* [online]. 2009, **10**(4), 660-669 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1021/bm801394s. ISSN 15257797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801394s>
- [30] STEINBÄCKEL, Alexander a Henry VALENTIN. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1995, **128**(3), 219-228 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x>
- [31] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. New York: Nova Science Publishers, 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [32] REHM, Bernd. *Polyhydroxyalkanoates*. 2015. Dostupné také z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=41298>
- [33] LU, Jingnan, Christopher BRIGHAM, Sophia LI a Anthony SINSKEY. *Ralstonia eutropha* H16 as a Platform for the Production of Biofuels, Biodegradable Plastics, and Fine Chemicals from Diverse Carbon Resources. *Biotechnology for Biofuel Production*

- and Optimization* [online]. Elsevier, 2016, s. 325 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63475-7.00012-1. ISBN 9780444634757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444634757000121>
- [34] Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for Autotrophic and Heterotrophic Production of Methyl Ketones. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2013, **79**(14), 4433–4439 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/79/14/4433.full.pdf>
- [35] Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biomedical and Advance Research* [online]. 2014, **5**(2), 68-76 [cit. 2017-03-01]. ISSN 22293809. Dostupné z: <http://www.ss-journals.com/index.php/ijbar/article/viewFile/454/452>
- [36] RIESEBERG, Marco, Cornelia KASPER, Kenneth REARDON a Thomas SCHEPER. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001, **56**(3-4), 350-360 [cit. 2017-03-01]. DOI: 10.1007/s002530100673. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530100673>
- [37] Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* [online]. 1998, **14**(2), 147-160 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Deere/publication/227888217_Flow_cytometry_and_cell_sorting_for_yeast_viability_assessment_and_selection/links/5440efcb0cf228087b69a27c.pdf
- [38] Fluidics System. In: *Bio-rad-antibodies* [online]. 2017 [cit. 2017-03-11].
- [39] Introduction to flow cytometry. In: *Abcam* [online]. 1998-2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- [40] Propidium iodide. In: *Sigmaaldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC., 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/propidiumiodide668392553516411?lang=en®ion=CZ>
- [41] Nile Red. In: *Sigmaaldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC., 2017 [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3013?lang=en®ion=CZ>

7 SKRATKY

ASP	Acid-shock proteín
ATP	Adenosintrifosfát
CSP	Cold-stress proteín
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FID	Plameňový ionizačný detektor
Fur	Ferric uptake regulation
HSP	Heat-shock proteín
NB	Nutrient Broth médium
OD	Optická hustota
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Poly(3-hydroxybutyrát)
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PI	Propidium jodid
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktívne dusíkaté častice
ROS	Reaktívne kyslíkové častice
SOD	Superoxiddismutáza

8 ZOZNAM PRÍLOH

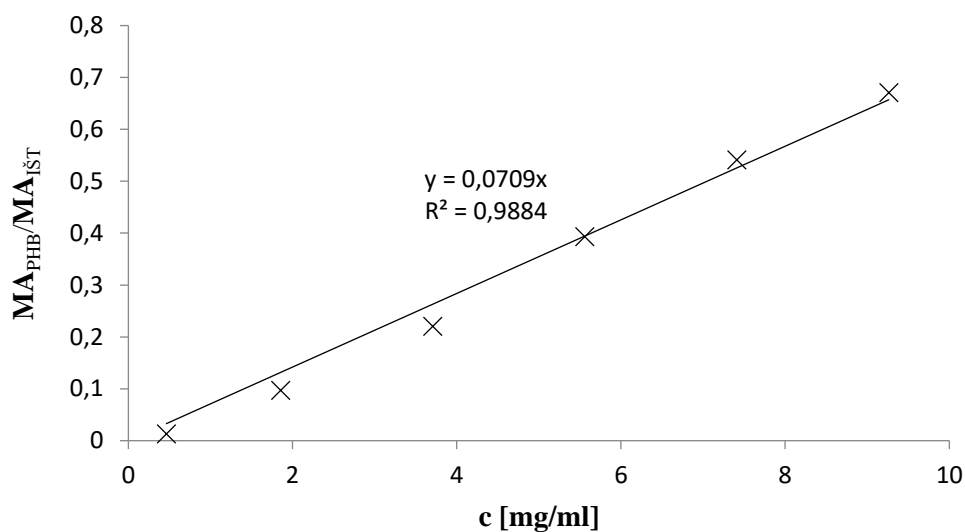
Graf 20: Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu PHB

Obrázok 17: Chromatogram z plynovej chromatografie s FID detektorom; 3HB s retenčným časom 1,09 a 3HV s retenčným časom 1,57

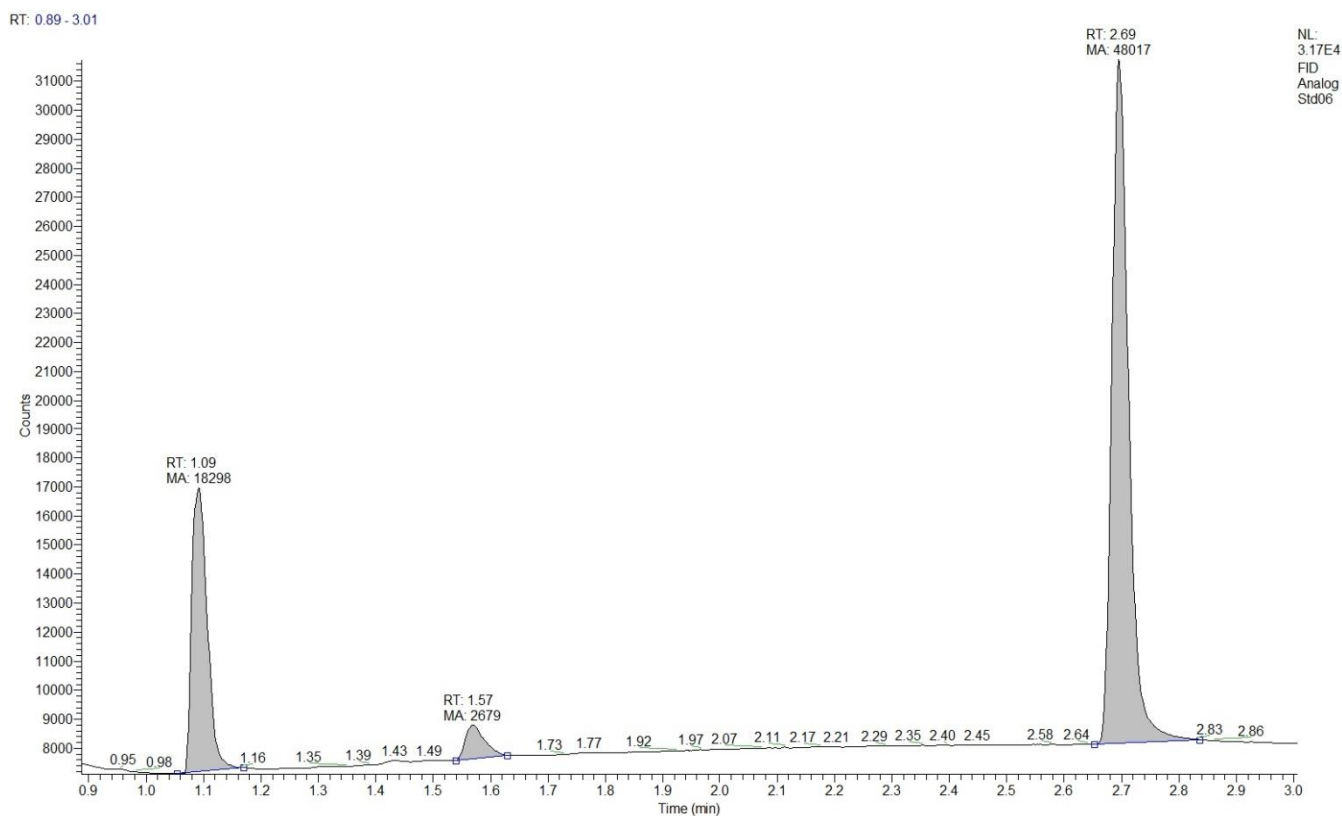
*Graf 21: Preložené prvé tri body z rastovej krivky kmeňa *Cupriavidus necator* H16 pri rôznych teplotách*

*Graf 22: Preložené prvé tri body z rastovej krivky kmeňa *Cupriavidus necator* PHB-4/H16 pri rôznych teplotách*

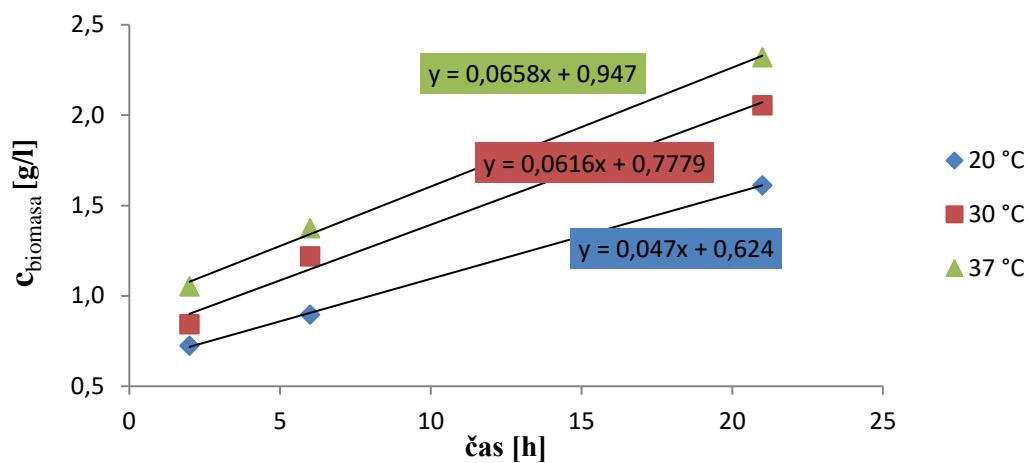
9 PRÍLOHY



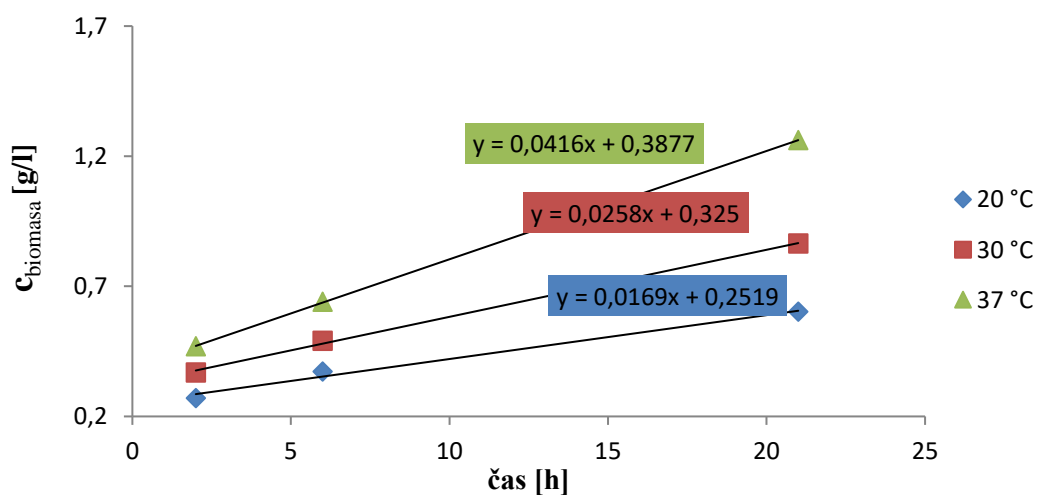
Graf 23: Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu PHB



Obrázok 18: Chromatogram z plynovej chromatografie s FID detektorom; 3HB s retenčným časom 1,09 a 3HV s retenčným časom 1,57



Graf 24: Preložené prvé tri body z rastovej krivky kmeňa *Cupriavidus necator* H16 pri rôznych teplotách



Graf 25: Preložené prvé tri body z rastovej krivky kmeňa *Cupriavidus necator* PHB-4/H16 pri rôznych teplotách